

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-509643

(P2017-509643A)

(43) 公表日 平成29年4月6日(2017.4.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-557946 (P2016-557946)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月18日 (2015.3.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年11月11日 (2016.11.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/021322
 (87) 国際公開番号 W02015/143079
 (87) 国際公開日 平成27年9月24日 (2015.9.24)
 (31) 優先権主張番号 61/955,663
 (32) 優先日 平成26年3月19日 (2014.3.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/981,641
 (32) 優先日 平成26年4月18日 (2014.4.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/007,385
 (32) 優先日 平成26年6月3日 (2014.6.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 597160510
 リジェネロン・ファーマシューティカルズ
 ・インコーポレイテッド
 REGENERON PHARMACEU
 TICALS, INC.
 アメリカ合衆国10591-6707ニュ
 ヨーク州タリータウン、オールド・ソー
 ・ミル・リバー・ロード777番
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍治療のための抗体組成物

(57) 【要約】

本発明は、C D 3 及び腫瘍抗原に結合する二重特異的抗体、及びその使用方法を提供する。一定の実施形態によれば、本発明の二重特異的抗体は低下したエフェクター機能を示し、F c γ 受容体に関してユニークな結合プロファイルを有する。この二重特異的抗体は、T細胞に媒介された腫瘍細胞の殺滅を効率的に誘導するように操作される。一定の実施形態によれば、本発明は、ヒトC D 3 に特異的に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒトC D 2 0 に特異的に結合する第二の抗原結合性ドメイン、及び特異的な結合パターンでF c γ 受容体に結合するF c ドメインを具備する二重特異的抗原結合性分子を提供する。一定の実施形態において、本発明の二重特異的抗原結合性分子は、C D 2 0 を発現するB細胞またはメラノーマ腫瘍の増殖を阻害することができる。本発明の二重特異的抗体は、種々の癌、並びに他のC D 2 0 関連疾患及び障害の治療に有用である。

【選択図】 図 1

Construction of chimeric hinge

Upper Hinge																											
WGL	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	Lower Hinge													
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
WGL	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
WGL	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227														
numbering																											
gp33	59	216	217	218	219	220	221	22																			

* means the corresponding number reported

— means no corresponding amino acid
 * numbering according to the last updated IMGT/RT database, the international immunogenetics information system, http://www.immgen.org/IMGT/RT/database/numbering/rt/rt_2016.html, (retrieved 17 May 2016), last updated (01 Jun 2016)
 * numbering according to EU index as reported by Kabat, E. A. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 93-2442 (1993)

FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験者における腫瘍増殖を抑制するための二重特異的抗体の使用であって、前記二重特異的抗体は、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメイン、及び第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラFcドメインを含んでいる前記使用。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の使用であって、腫瘍増殖を抑制することは、(a)被験者における腫瘍増殖を阻害し、(b)被験者における腫瘍のサイズを減少させ、または(c)被験者における腫瘍の数を減少させる前記使用。

10

【請求項 3】

B細胞溶解を媒介するための二重特異的抗体の使用であって、前記二重特異的抗体は、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメインと、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメインと、前記第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラFcドメインを具備する前記使用。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の使用であって、前記B細胞はプレBリンパ球、成熟Bリンパ球、またはB細胞非ホジキンリンパ腫細胞である前記使用。

【請求項 5】

被験者におけるB細胞癌を治療するための二重特異的抗体の使用であって、前記二重特異的抗体は、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメインと、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメインと、前記第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラFcドメインを具備する前記使用。

20

【請求項 6】

請求項 5 に記載の使用であって、前記B細胞癌は、濾胞性リンパ腫、B細胞慢性リンパ球性白血病、B細胞リンパ芽球性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、瀰漫性大細胞型B細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病及びパーキットリンパ腫からなる群から選択される前記使用。

【請求項 7】

請求項 5 または 6 に記載の使用であって、前記被験者は(a)抗CD20単一特異性療法単独、または(b)リツキシマブ単剤療法に対して抵抗性であるか、または不完全に反応する腫瘍に罹患している前記使用。

30

【請求項 8】

請求項 5 ~ 7 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記被験者は、二重特異的抗体の投与の少なくとも 1 日ないし 1 年前に、抗CD20単一特異性抗体療法を受けている前記使用。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の使用であって、前記抗CD20単一特異性療法は、抗CD20単一特異性抗体を含むか、または該抗体からなる前記使用。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の使用であって、前記抗CD20単一特異性抗体はリツキシマブである前記使用。

40

【請求項 11】

被験者においてB細胞癌を治療するための二重特異的抗体の使用であって、(a)抗CD20単一特異性療法単独に対して抵抗性、または不完全に応答する癌に罹患している被験者を選択することと、(b)前記被験者に対して、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメイン、並びに前記第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラFcドメインを具備する治療量の二重特異的抗体を投与することを含む前記使用。

【請求項 12】

50

請求項 1 1 に記載の使用であって、前記被験者は、抗 C D 2 0 単一特異性療法に対して抵抗性であるか、耐性であるか、または不完全に反応する腫瘍を有することに基づいて選択される前記使用。

【請求項 1 3】

請求項 1 1 または 1 2 に記載の使用であって、抗 C D 2 0 単一特異性療法は、抗 C D 2 0 単一特異性抗体を含むか、または該抗体からなる前記使用。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の使用であって、前記抗 C D 2 0 単一特異性抗体はリツキシマブである前記使用。

【請求項 1 5】

請求項 5 ~ 1 4 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記 B 細胞癌はリンパ腫である前記使用。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の使用であって、前記リンパ腫は非ホジキンリンパ腫 (N H L) である前記使用。

【請求項 1 7】

請求項 5 ~ 1 4 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記 B 細胞癌は慢性リンパ性白血病 (C L L) である前記使用。

【請求項 1 8】

被験者において B 細胞癌を治療するための二重特異的抗体の使用であって、前記二重特異的抗体は、ヒト C D 3 に結合する第一の抗原結合性ドメインと、ヒト C D 2 0 に結合する第二の抗原結合性ドメインと、前記第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラ F c ドメインを具備し、また前記二重特異的抗体は、前記被験者において腫瘍の負担を軽減し、腫瘍退縮を生じさせ、腫瘍増殖を阻害し、または腫瘍発生を減少させるのに十分な量で投与される前記使用。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の使用であって、前記 B 細胞癌は、濾胞性リンパ腫、B 細胞慢性リンパ球性白血病、B 細胞リンパ芽球性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、瀰漫性大細胞型 B 細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病及びパーキットリンパ腫からなる群から選択される前記使用。

【請求項 2 0】

請求項 1 8 または 1 9 に記載の使用であって、前記被験者は、抗 C D 2 0 単一特異性療法単独に対して抵抗性であるか、または不完全に反応する腫瘍に罹患している前記使用。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載の使用であって、前記被験者は、リツキシマブ単剤療法に対して抵抗性であるか、または不完全に反応する腫瘍に罹患している前記使用。

【請求項 2 2】

請求項 1 8 ~ 2 1 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記被験者は、二重特異的抗体の投与の少なくとも 1 日前ないし 1 年前に、抗 C D 2 0 単一特異性抗体療法を受けている前記使用。

【請求項 2 3】

請求項 2 0 に記載の使用であって、前記抗 C D 2 0 単一特異性抗体療法は、抗 C D 2 0 単一特異性抗体を含むか、または該抗体からなる前記使用。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の使用であって、前記抗 C D 2 0 単一特異性抗体はリツキシマブである前記使用。

【請求項 2 5】

請求項 1 8 ~ 2 4 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記被験者において腫瘍の負担を軽減し、腫瘍の退縮を生じさせ、腫瘍増殖を阻害し、または腫瘍の発生を減少させるために十分な前記量は、約 0 . 0 0 1 m g / k g ~ 約 1 m g / k g である前記使用。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

請求項 25 に記載の使用であって、前記被験者において腫瘍の負担を軽減し、腫瘍の退縮を生じさせ、腫瘍増殖を阻害し、または腫瘍の発生を減少させるために十分な前記量は、約 0.4 mg / kg である前記使用。

【請求項 27】

被験者において、CD20 発現について陽性の癌を治療するための二重特異的抗体の使用であって、該使用は (a) 癌及び / または腫瘍に罹患している被験者を選択することと、(b) が該被験者から 1 以上の生物学的サンプルを収集することと、(c) 前記 1 以上のサンプルにおいて CD20 を発現する癌細胞または腫瘍細胞を同定することと、(b) 前記被験者に対して、ヒト CD3 に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒト CD20 に結合する第二の抗原結合性ドメイン、並びに前記第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラ Fc ドメインを具備する治療的量の二重特異的抗体を投与することを含む前記使用。

10

【請求項 28】

請求項 27 に記載の使用であって、前記被験者は、抗 CD20 療法に対して抵抗性であるか、耐性であるか、または不完全に反応する癌または腫瘍を有することに基づいて選択される前記使用。

【請求項 29】

請求項 27 に記載の使用であって、前記被験者は、残留癌を有することに基づいて選択される前記使用。

20

【請求項 30】

請求項 27 ~ 29 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗 CD20 療法は、抗 CD20 単一特異性抗体を含み、または該抗体からなる前記使用。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の使用であって、前記抗 CD20 単一特異性抗体はリツキシマブである前記使用。

【請求項 32】

請求項 27 ~ 31 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記癌はリンパ腫または白血病である前記使用。

【請求項 33】

請求項 32 に記載の使用であって、前記リンパ腫は、濾胞性リンパ腫、B 細胞慢性リンパ球性白血病、B 細胞リンパ芽球性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、瀰漫性大細胞型 B 細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病及びパーキットリンパ腫からなる群から選択される前記使用。

30

【請求項 34】

請求項 32 に記載の使用であって、前記白血病は、B 細胞慢性リンパ球性白血病 (CLL) である前記使用。

【請求項 35】

被験者において、CD20 を発現するメラノーマ癌を治療するための二重特異的抗体の使用であって、ヒト CD3 に結合する第一の抗原結合性ドメインと、ヒト CD20 に結合する第二の抗原結合性ドメインと、前記第一及び第二の抗原結合性ドメインの各々に繋がれたキメラ Fc ドメインを具備する治療的量の二重特異的抗体を投与することを含んでなり、ここでの前記量は腫瘍の負担を軽減し、腫瘍増殖を阻害し、または腫瘍の腫瘍の発生を減少させるために十分である使用。

40

【請求項 36】

請求項 1 ~ 35 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、インビトロアッセイで測定したときに、それがヒト FcγRIIB、ヒトの FcγRI 及び / またはヒトの FcγRIII に結合するよりも高い親和性で、ヒト FcγRIIA に結合することができる前記使用。

【請求項 37】

50

請求項 1 ~ 3 6 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、インビトロアッセイで測定したときに、該抗体がヒト F c γ R I またはヒト F c γ R I I I に結合するよりも高い親和性で、ヒト F c γ R I I A 及びヒト F c γ R I I B に結合することができる前記使用。

【請求項 3 8】

請求項 1 ~ 3 7 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、ヒト F c γ R I I A 及びヒト F c γ R I I B の両方に結合し、且つインビトロアッセイで測定したときに、ヒト F c γ R I 及びヒト F c γ R I I I の各々に対して $1 \mu M$ K_D 未満の結合親和性を示す前記使用。

【請求項 3 9】

請求項 1 ~ 3 8 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、インビトロアッセイで測定したときに、ヒト F c γ R I I B への結合に比較して、ヒト F c γ R I I A についてより高い結合親和性を示す前記使用。

【請求項 4 0】

請求項 1 ~ 3 9 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体はヒト F c γ R I I A に結合し、インビトロアッセイで測定したときに、ヒト F c γ R I I B に対するその結合に比較してより低い K_D 値を示す前記使用。

【請求項 4 1】

請求項 1 ~ 4 0 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は 2 5 においてヒト F c γ R I I A に結合し、インビトロアッセイで測定したときに $10 \sim 30 \mu M$ の K_D 値を有する前記使用。

【請求項 4 2】

請求項 1 ~ 4 1 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は 2 5 においてヒト F c γ R I I B に結合し、インビトロアッセイで測定したときに $100 \sim 250 \mu M$ の K_D 値を有する前記使用。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 4 2 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体はインビトロアッセイで測定したときに、ヒト F c γ R I に対して検出可能な結合親和性を僅かしか、または全く示さない前記使用。

【請求項 4 4】

請求項 1 ~ 4 3 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体はインビトロアッセイで測定したときに、ヒト F c γ R I I I に対して検出可能な結合親和性を僅かしか、または全く示さない前記使用。

【請求項 4 5】

請求項 3 6 ~ 4 4 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記インビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴アッセイである前記使用。

【請求項 4 6】

請求項 1 ~ 4 5 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、インビトロ細胞傷害性アッセイで測定したときに、野生型 F c ドメインを含む抗体に比較して低下した抗体依存性細胞障害性 (A D C C) を示す前記使用。

【請求項 4 7】

請求項 4 6 に記載の使用であって、前記抗体は無視できる抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) を示し、または検出可能な A D C C を示さない前記使用。

【請求項 4 8】

請求項 1 ~ 4 7 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、インビトロ細胞傷害性アッセイで測定したときに、野生型 F c ドメインを含む抗体と比較して減少した補体依存性細胞傷害性 (C D C) を示す前記使用。

【請求項 4 9】

請求項 4 8 に記載の使用であって、前記抗体は、インビトロアッセイでの細胞溶解の測定により決定したときに、50%未満の細胞傷害性を示す前記使用。

10

20

30

40

50

【請求項 50】

請求項 48 または 49 に記載の使用であって、前記抗体は、無視できる補体依存性細胞傷害性 (CDC) を示し、または検出可能な CDC を示さない前記使用。

【請求項 51】

請求項 1 ~ 50 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、野生型 Fc ドメインを含む抗体と比較して、NK 細胞またはマクロファージのような Fc 受容体を有する細胞の減少した T 細胞媒介性死滅を誘導する前記使用。

【請求項 52】

請求項 1 ~ 51 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、野生型 Fc ドメインを備えた抗体と比較して、NK 細胞またはマクロファージのような Fc 受容体を有する細胞により媒介される減少した T 細胞死滅を誘導する前記使用。

10

【請求項 53】

請求項 1 ~ 52 の何れか 1 項に記載の使用であって、インビトロアッセイにおける K_D の測定により検出されたときに、前記抗体は、ヒト Fc γ R I I A > ヒト Fc γ R I I B > ヒト Fc γ R I > = ヒト Fc γ R I I I の序列での抗原に対する結合親和性を示す前記使用。

【請求項 54】

請求項 1 ~ 52 の何れか 1 項に記載の使用であって、インビトロアッセイにおける K_D の測定により検出されたときに、前記抗体は、ヒト Fc γ R I I A > ヒト Fc γ R I I B > ヒト Fc γ R I I I > = ヒト Fc γ R I の序列での抗原に対する結合親和性を示す前記使用。

20

【請求項 55】

請求項 53 または 54 に記載の使用であって、前記ヒト Fc γ R I I I は、ヒト Fc γ R I I I A またはヒト Fc γ R I I I B である前記使用。

【請求項 56】

請求項 1 ~ 55 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記キメラ Fc ドメインはキメラヒンジを具備する前記使用。

【請求項 57】

請求項 56 に記載の使用であって、前記キメラヒンジは、位置 228 ~ 236 (EU 番号付け) のヒト Ig G 2 下側ヒンジ部アミノ酸配列 PCPAPPVA (配列番号 52) を含む前記使用。

30

【請求項 58】

請求項 56 または 57 に記載の使用であって、前記キメラヒンジは、位置 216 ~ 227 (EU 番号付け) のヒト Ig G 1 またはヒト Ig G 4 上側ヒンジ部のアミノ酸配列を含む前記使用。

【請求項 59】

請求項 58 に記載の使用であって、前記抗体は、キメラヒンジのアミノ酸配列 EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (配列番号 53) を含む前記使用。

【請求項 60】

請求項 58 に記載の使用であって、前記抗体は、キメラヒンジのアミノ酸配列 ESKYGPPCPPPCPAPPVA (配列番号 54) を含む前記使用。

40

【請求項 61】

請求項 1 ~ 60 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記 Fc ドメインは、位置 237 ~ 340 (EU 番号付け) のヒト Ig G 4・CH2 ドメインアミノ酸配列を含む前記使用。

【請求項 62】

請求項 61 に記載の使用であって、前記 Fc ドメインは、ヒト Ig G 1・CH3 ドメインまたはヒト Ig G 4・CH3 ドメイン由来の CH3 ドメインを含む前記使用。

【請求項 63】

請求項 61 または 62 に記載の使用であって、前記 Fc ドメインは、ヒト Ig G 1・C

50

H 1 ドメイン及びヒト I g G 1 ・ C H 3 ドメインを含む前記使用。

【請求項 6 4】

請求項 6 1 または 6 2 に記載の使用であって、前記 F c ドメインは、ヒト I g G 4 ・ C H 1 ドメイン及びヒト I g G 4 ・ C H 3 ドメインを含む前記使用。

【請求項 6 5】

請求項 1 ～ 3 5 の何れか 1 項に記載の使用であって、二重特異的抗体はキメラ重鎖定常 (C H) 領域を具備し、

(a) 前記キメラ C H 領域はヒト F c γ R I I A 及びヒト F c γ R I I B に結合し、

(b) 前記キメラ C H は、野生型 C H 領域を備えた抗体に比較して、より低い親和性または親和性なしで、ヒト F c γ R I 及びヒトの F c γ R I I I に結合する前記使用。

10

【請求項 6 6】

請求項 6 5 に記載の使用であって、前記キメラ C H 領域はキメラヒンジを具備する前記使用。

【請求項 6 7】

請求項 6 6 に記載の使用であって、前記キメラヒンジは、位置 2 2 8 ～ 2 3 6 (E U 番号付け) におけるヒト I g G 2 下側ヒンジ部のアミノ酸配列 P C P A P P V A (配列番号 5 2) を含む前記使用。

【請求項 6 8】

請求項 6 6 または 6 7 に記載の使用であって、前記キメラヒンジは、位置 2 1 6 ～ 2 2 7 (E U 番号付け) におけるヒト I g G 1 またはヒト I g G 4 上側ヒンジ部のアミノ酸配列を含む前記使用。

20

【請求項 6 9】

請求項 6 5 ～ 6 8 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記キメラ C H 領域は、キメラヒンジアミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P P V A (配列番号 5 3) を含む前記使用。

【請求項 7 0】

請求項 6 5 ～ 6 8 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記キメラ C H 領域は、キメラヒンジアミノ酸配列 E S K Y G P P C P P C P A P P V A (配列番号 5 4) を含む前記使用。

【請求項 7 1】

請求項 6 5 ～ 7 0 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記 C H 領域は、位置 2 3 7 ～ 3 4 0 (E U 番号付け) のヒト I g G 4 ・ C H 2 ドメインアミノ酸配列を含む前記使用。

30

【請求項 7 2】

請求項 7 1 に記載の使用であって、前記キメラ C H 領域は、ヒト I g G 1 ・ C H 3 ドメインまたはヒト I g G 4 ・ C H 3 ドメイン由来の C H 3 ドメインを含む前記使用。

【請求項 7 3】

請求項 7 2 に記載の使用であって、前記キメラ C H 領域は、ヒト I g G 1 ・ C H 1 ドメイン及びヒト I g G 1 ・ C H 3 ドメインを含む前記使用。

【請求項 7 4】

請求項 7 3 に記載の使用であって、前記キメラ C H 領域は、ヒト I g G 4 ・ C H 1 ドメイン及びヒト I g G 4 ・ C H 3 ドメインを含む前記使用。

40

【請求項 7 5】

請求項 1 ～ 7 4 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号 1 0 を含む重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列を具備する前記使用。

【請求項 7 6】

請求項 1 ～ 7 5 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号 1 8 を含む軽鎖可変領域 (L C V R) アミノ酸配列を具備する前記使用。

【請求項 7 7】

請求項 1 ～ 7 6 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記第二の抗原結合性ドメインは、配列番号 2 を含む重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列を具備する前記使用。

50

【請求項 78】

請求項 1 ～ 77 の何れか 1 項に記載の使用であって、ヒト CD3 に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号 10 を含む重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列、及び配列番号 18 を含む軽鎖可変領域 (L C V R) アミノ酸配列を具備する前記使用。

【請求項 79】

請求項 1 ～ 77 の何れか 1 項に記載の使用であって、ヒト CD20 に特異的に結合する前記第二の抗原結合性ドメインは、配列番号 2 を含む重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列、及び配列番号 18 を含む軽鎖可変領域 (L C V R) アミノ酸配列を具備する前記使用。

10

【請求項 80】

請求項 1 ～ 79 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記第一の抗原結合性ドメイン (A 1) は、三つの重鎖相補性決定領域 (H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3) を含み、
ここで、

- (a) A 1 - H C D R 1 は、配列番号 12 のアミノ酸配列を含み、
- (b) A 1 - H C D R 2 は、配列番号 14 のアミノ酸配列を含み、
- (c) A 1 - H C D R 3 は、配列番号 16 のアミノ酸配列を含み、
- (d) A 1 - L C D R 1 は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、
- (e) A 1 - L C D R 2 は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、
- (f) A 1 - L C D R 3 は、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む

20

前記使用。

【請求項 81】

請求項 1 ～ 79 の何れか 1 項に記載の使用であって、ヒト CD20 に特異的に結合する前記第二の抗原結合性ドメインは (A 2) は、三つの重鎖相補性決定領域 (H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3) を含み、
ここで、

- (a) A 2 - H C D R 1 は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、
- (b) A 2 - H C D R 2 は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、
- (c) A 2 - H C D R 3 は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、
- (d) A 2 - L C D R 1 は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、
- (e) A 2 - L C D R 2 は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、
- (f) A 2 - L C D R 3 は、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む

30

前記使用。

【請求項 82】

請求項 1 ～ 81 の何れか 1 項に記載の使用であって、ヒト CD3 に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメイン (A 1) は、三つの重鎖相補性決定領域 (A 1 - H C D R 1、A 1 - H C D R 2、A 1 - H C D R 3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (A 1 - L C D R 1、A 1 - L C D R 2、A 1 - L C D R 3) を含み、またヒト CD20 に特異的に結合する前記第二の抗原結合性ドメインは (A 2) は、三つの重鎖相補性決定領域 (A 2 - H C D R 1、A 2 - H C D R 2、A 2 - H C D R 3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (A 2 - L C D R 1、A 2 - L C D R 2、A 2 - L C D R 3) を含み、
ここで、

40

- (a) A 1 - H C D R 1 は、配列番号 12 のアミノ酸配列を含み、
- (b) A 1 - H C D R 2 は、配列番号 14 のアミノ酸配列を含み、
- (c) A 1 - H C D R 3 は、配列番号 16 のアミノ酸配列を含み、
- (d) A 1 - L C D R 1 は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、
- (e) A 1 - L C D R 2 は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、
- (f) A 1 - L C D R 3 は、配列番号 24 のアミノ酸配列を含み

50

- (g) A2 - HCDR1 は、配列番号4のアミノ酸配列を含み、
- (h) A2 - HCDR2 は、配列番号6のアミノ酸配列を含み、
- (i) A2 - HCDR3 は、配列番号8のアミノ酸配列を含み、
- (j) A2 - LCDR1 は、配列番号20のアミノ酸配列を含み、
- (k) A2 - LCDR2 は、配列番号22のアミノ酸配列を含み、
- (l) A2 - LCDR3 は、配列番号24のアミノ酸配列を含む

前記使用。

【請求項83】

請求項1～74の何れか1項に記載の使用であって、前記第一の抗原結合性ドメインはヒトCD3への結合について、三つの重鎖相補性決定領域(A1 - HCDR1、A1 - HCDR2及びA1 - HCDR3)及び三つの軽鎖相補性決定領域(A1 - LCDR1、A1 - LCDR2及びA1 - LCDR3)を含む基準の抗原結合タンパク質と競合し、ここで(i) A1 - HCDR1は配列番号12のアミノ酸配列を含み、(ii) A1 - CDR2は配列番号14のアミノ酸配列を含み、(iii) A1 - HCDR3は配列番号16のアミノ酸配列を含み、(iv) A1 - LCDR1は配列番号20のアミノ酸配列を含み、(v) A1 - LCDR2は配列番号22のアミノ酸配列を含み、また(vi) A1 - CDR3は配列番号24のアミノ酸配列を含む前記使用。

10

【請求項84】

請求項83に記載の使用であって、前記第一の抗原結合性ドメインはヒトCD3への結合について、(i) 配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(HCVR)、及び(ii) 配列番号18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(LCVR)を含む基準の抗原結合性タンパク質と競合する前記使用。

20

【請求項85】

請求項1～74の何れか1項に記載の使用であって、前記第二の抗原結合性ドメインはヒトCD20への結合について、三つの重鎖相補性決定領域(A2 - HCDR1、A2 - HCDR2及びA2 - HCDR3)及び三つの軽鎖相補性決定領域(A2 - LCDR1、A2 - LCDR2及びA2 - LCDR3)を含む基準の抗原結合タンパク質と競合し、ここで(i) A2 - HCDR1は配列番号4のアミノ酸配列を含み、(ii) A2 - CDR2は配列番号6のアミノ酸配列を含み、(iii) A2 - HCDR3は配列番号8のアミノ酸配列を含み、(iv) A2 - LCDR1は配列番号20のアミノ酸配列を含み、(v) A2 - LCDR2は配列番号22のアミノ酸配列を含み、また(vi) A2 - CDR3は配列番号24のアミノ酸配列を含む前記使用。

30

【請求項86】

請求項85に記載の使用であって、前記第二の抗原結合性ドメインはヒトCD20への結合について、(i) 配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(HCVR)、及び(ii) 配列番号18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(LCVR)を含む基準の抗原結合性タンパク質と競合する前記使用。

【請求項87】

請求項1～74の何れか1項に記載の使用であって、前記第一の抗原結合性ドメインはヒトCD3への結合について、(i) 配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(HCVR)、及び(ii) 配列番号18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(LCVR)を含む基準の抗原結合タンパク質と競合し、また前記第二の抗原結合性ドメインはヒトCD20への結合について、(iii) 配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(HCVR)、及び配列番号18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(LCVR)を含む基準の抗原結合性タンパク質と競合する前記使用。

40

【請求項88】

請求項1～87の何れか1項に記載の使用であって、前記抗体はヒトCD3を発現するヒト細胞及びカニクイザルCD3を発現するカニクイザル細胞に結合する前記使用。

【請求項89】

請求項1～88の何れか1項に記載の使用であって、前記抗体はヒトT細胞及びカニク

50

イザル T 細胞に結合する前記使用。

【請求項 90】

請求項 1 ~ 89 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体はヒト CD20 を発現するヒト細胞に結合する前記使用。

【請求項 91】

請求項 1 ~ 90 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体はヒト B 細胞に結合する前記使用。

【請求項 92】

請求項 1 ~ 91 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、 $1 \times 10^{-12} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の EC_{50} 値で、CD3 を発現するヒト T 細胞に結合する前記使用。

10

【請求項 93】

請求項 1 ~ 92 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ の EC_{50} 値で、CD3 を発現するヒト T 細胞に結合する前記使用。

【請求項 94】

請求項 1 ~ 93 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、 $1 \times 10^{-12} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の EC_{50} 値で、CD20 を発現するヒト B 細胞に結合する前記使用。

【請求項 95】

請求項 1 ~ 94 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、 $1 \times 10^{-9} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ の EC_{50} 値で、CD20 を発現するヒト B 細胞に結合する前記使用。

【請求項 96】

20

請求項 1 ~ 95 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、抗 CD20 に媒介される細胞傷害性に対して耐性または不応性であるヒト B 細胞の、T 細胞に媒介された細胞傷害性を増強する前記使用。

【請求項 97】

請求項 1 ~ 96 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記被験者への少なくとも約 0.01 mg/kg の用量での前記二重特異的抗体の単回投与は、前記被験者への前記二重特異的抗体の投与後約 2 日までに、前記被験者における B 細胞数を検出可能なレベル未満にまで低下させる前記使用。

【請求項 98】

請求項 97 に記載の使用であって、前記被験者への、少なくとも約 0.01 mg/kg の単一用量での前記二重特異的抗体の投与の少なくとも約 7 日後まで、前記 B 細胞の数は検出可能なレベル未満に維持される前記使用。

30

【請求項 99】

ヒト CD3 に結合する第一の抗原結合性ドメインと、ヒト CD20 に結合する第二の抗原結合性ドメインと、第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラ Fc ドメインを具備する二重特異的抗体。

【請求項 100】

請求項 99 に記載の二重特異的抗体であって、インビトロアッセイで測定したときに、該抗体はヒト FcγRIIB、ヒトの FcγRI 及び / またはヒトの FcγRIII に結合するよりも高い親和性で、ヒト FcγRIIA に結合することができる前記二重特異的抗体。

40

【請求項 101】

請求項 99 にまたは 100 に記載の二重特異的抗体であって、インビトロアッセイで測定したときに、該抗体はヒト FcγRI またはヒト FcγRIII に結合するよりも高い親和性で、ヒト FcγRIIA 及びヒト FcγRIIB に結合することができる前記二重特異的抗体。

【請求項 102】

請求項 99 ~ 101 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、ヒト FcγRIIA 及びヒト FcγRIIB の両方に結合し、且つインビトロアッセイで測定したときに、ヒト FcγRI 及びヒト FcγRIII の各々に対して $1 \mu \text{M}$ K_D 未満の結合親和性を示

50

す前記二重特異的抗体。

【請求項 103】

請求項 99 ~ 102 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、インビトロアッセイで測定したときに、ヒト FcγRIIB への結合に比較して、ヒト FcγRIIA についてより高い結合親和性を示す前記二重特異的抗体。

【請求項 104】

請求項 99 ~ 103 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、ヒト FcγRIIA に結合し、インビトロアッセイで測定したときに、ヒト FcγRIIB に対するその結合に比較してより低い K_D 値を示す前記二重特異的抗体。

【請求項 105】

請求項 99 ~ 104 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、25 においてヒト FcγRIIA に結合し、インビトロアッセイで測定したときに 10 ~ 30 μM の K_D 値を有する前記二重特異的抗体。

【請求項 106】

請求項 99 ~ 105 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、25 において FcγRIIB に結合し、インビトロアッセイで測定したときに 100 ~ 250 μM の K_D 値を有する前記二重特異的抗体。

【請求項 107】

請求項 99 ~ 106 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、インビトロアッセイで測定したときに、ヒト FcγRI に対して検出可能な結合親和性を僅かしか、または全く示さない前記二重特異的抗体。

【請求項 108】

請求項 99 ~ 107 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、インビトロアッセイで測定したときに、ヒト FcγRIII に対して検出可能な結合親和性を僅かしか、または全く示さない前記二重特異的抗体。

【請求項 109】

請求項 100 ~ 108 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、前記インビトロアッセイは表面プラズモン共鳴アッセイである前記二重特異的抗体。

【請求項 110】

請求項 99 ~ 109 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、インビトロ細胞傷害性アッセイで測定したときに、野生型 Fcドメインを含む抗体に比較して低下した抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を示す前記二重特異的抗体。

【請求項 111】

請求項 110 に記載の二重特異的抗体であって、無視できる抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を示し、または検出可能な ADCC を示さない前記二重特異的抗体。

【請求項 112】

請求項 99 ~ 111 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、インビトロ細胞傷害性アッセイで測定したときに、野生型 Fcドメインを含む抗体と比較して減少した補体依存性細胞傷害性 (CDC) を示す前記二重特異的抗体。

【請求項 113】

請求項 112 に記載の二重特異的抗体であって、インビトロアッセイでの細胞溶解の測定により決定したときに、50 % 未満の細胞傷害性を示す前記二重特異的抗体。

【請求項 114】

請求項 112 または 113 に記載の二重特異的抗体であって、無視できる補体依存性細胞傷害性 (CDC) を示し、または検出可能な CDC を示さない前記二重特異的抗体。

【請求項 115】

請求項 99 ~ 114 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、野生型 Fcドメインを含む抗体と比較して、NK 細胞またはマクロファージのような Fc 受容体を有する細胞の減少した T 細胞媒介性死滅を誘導する前記二重特異的抗体。

【請求項 116】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 17 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、野生型 F c ドメインを備えた抗体に比較して、NK 細胞またはマクロファージのような F c 受容体を有する細胞により媒介される減少した T 細胞死滅を誘導する前記二重特異的抗体。

【請求項 117】

請求項 99 ~ 116 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、インビトロアッセイにおける K_D の測定により検出されたときに、ヒト F c γ R I I A > ヒト F c γ R I I B > ヒト F c γ R I > = ヒト F c γ R I I I の序列での抗原に対する結合親和性を示す前記二重特異的抗体。

【請求項 118】

請求項 99 ~ 116 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、インビトロアッセイにおける K_D の測定により検出されたときに、ヒト F c γ R I I A > ヒト F c γ R I I B > ヒト F c γ R I I I > = ヒト F c γ R I の序列での抗原に対する結合親和性を示す前記二重特異的抗体。

10

【請求項 119】

請求項 117 または 118 に記載の二重特異的抗体であって、前記ヒト F c γ R I I I は、ヒト F c γ R I I I A またはヒト F c γ R I I I B である前記二重特異的抗体。

【請求項 120】

請求項 99 ~ 119 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラ F c ドメインはキメラヒンジを具備する前記二重特異的抗体。

【請求項 121】

請求項 120 に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラヒンジは、位置 228 ~ 236 (E U 番号付け) のヒト I g G 2 下側ヒンジ部アミノ酸配列 P C P A P P V A (配列番号 52) を含む前記二重特異的抗体。

20

【請求項 122】

請求項 120 または 121 に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラヒンジは、位置 216 ~ 227 (E U 番号付け) のヒト I g G 1 またはヒト I g G 4 上側ヒンジ部アミノ酸配列を含む前記二重特異的抗体。

【請求項 123】

請求項 122 に記載の二重特異的抗体であって、キメラヒンジのアミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P P V A (配列番号 53) を含む前記二重特異的抗体。

30

【請求項 124】

請求項 122 に記載の二重特異的抗体であって、キメラヒンジのアミノ酸配列 E S K Y G P P C P P C P A P P V A (配列番号 54) を含む前記二重特異的抗体。

【請求項 125】

請求項 99 ~ 124 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、前記 F c ドメインは、位置 237 ~ 340 (E U 番号付け) のヒト I g G 4・C H 2 ドメインアミノ酸配列を含む前記二重特異的抗体。

【請求項 126】

請求項 125 に記載の二重特異的抗体であって、前記 F c ドメインは、ヒト I g G 1・C H 3 ドメインまたはヒト I g G 4・C H 3 ドメイン由来の C H 3 ドメインを含む前記二重特異的抗体。

40

【請求項 127】

請求項 125 または 126 に記載の二重特異的抗体であって、前記 F c ドメインは、ヒト I g G 1・C H 1 ドメイン及びヒト I g G 1・C H 3 ドメインを含む前記二重特異的抗体。

【請求項 128】

請求項 125 または 126 に記載の二重特異的抗体であって、前記 F c ドメインは、ヒト I g G 4・C H 1 ドメイン及びヒト I g G 4・C H 3 ドメインを含む前記二重特異的抗体。

【請求項 129】

50

第一の抗原結合性ドメイン、第二の抗原結合性ドメイン、及びキメラ重鎖定常（ＣＨ）領域を具備する二重特異的抗体であって、

（ａ）前記第一の抗原結合性ドメインはＣＤ３に結合し、

（ｂ）前記第二の抗原結合性ドメインはＣＤ２０に結合し、

（ｃ）前記キメラＣＨ領域はヒトＦｃγＲＩＩＡ及びヒトＦｃγＲＩＩＢに結合し、

（ｄ）前記決キメラＣＨ領域は、野生型ＣＨ領域を備えた抗体に比較して、より低い親和性または親和性なしで、ヒトＦｃγＲＩ及びヒトのＦｃγＲＩＩに結合する前記二重特異的抗体。

【請求項１３０】

請求項１２９に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラＣＨ領域はキメラヒンジを具備する前記二重特異的抗体。

10

【請求項１３１】

請求項１３０に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラヒンジは、位置２２８～２３６（ＥＵ番号付け）のヒトＩｇＧ２下側ヒンジ部アミノ酸配列ＰＣＰＡＰＰＶＡ（配列番号５２）を含む前記二重特異的抗体。

【請求項１３２】

請求項１３０または１３１に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラヒンジは、位置２１６～２２７（ＥＵ番号付け）のヒトＩｇＧ１またはヒトＩｇＧ４上側ヒンジ部アミノ酸配列を含む前記二重特異的抗体。

20

【請求項１３３】

請求項１２９～１３２の何れか１項に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラＣＨ領域は、キメラヒンジアミノ酸配列ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＰＶＡ（配列番号５３）を含む前記二重特異的抗体。

【請求項１３４】

請求項１２９～１３２の何れか１項に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラＣＨ領域は、キメラヒンジアミノ酸配列ＥＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＰＶＡ（配列番号５４）を含む前記二重特異的抗体。

【請求項１３５】

請求項１２９～１３４の何れか１項に記載の二重特異的抗体であって、前記ＣＨ領域は、位置２３７～３４０（ＥＵ番号付け）のヒトＩｇＧ４・ＣＨ２ドメインアミノ酸配列を含む前記二重特異的抗体。

30

【請求項１３６】

請求項１３５に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラＣＨ領域は、ヒトＩｇＧ１・ＣＨ３ドメインまたはヒトＩｇＧ４・ＣＨ３ドメイン由来のＣＨ３ドメインを含む前記二重特異的抗体。

【請求項１３７】

請求項１３６に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラＣＨ領域は、ヒトＩｇＧ１・ＣＨ１ドメイン及びヒトＩｇＧ１・ＣＨ３ドメインを含む前記二重特異的抗体。

【請求項１３８】

請求項１３７に記載の二重特異的抗体であって、前記キメラＣＨ領域は、ヒトＩｇＧ４・ＣＨ１ドメイン及びヒトＩｇＧ４・ＣＨ３ドメインを含む前記二重特異的抗体。

40

【請求項１３９】

請求項９９～１３８の何れか１項に記載の二重特異的抗体であって、前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号１０を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）アミノ酸配列を具備する前記二重特異的抗体。

【請求項１４０】

請求項９９～１３９の何れか１項に記載の二重特異的抗体であって、前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号１８を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）アミノ酸配列を具備する前記二重特異的抗体。

【請求項１４１】

50

請求項 99 ~ 140 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、前記第二の抗原結合性ドメインは、配列番号 2 を含む重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列を具備する前記二重特異的抗体。

【請求項 142】

請求項 99 ~ 141 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、ヒト C D 3 に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号 10 を含む重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列、及び配列番号 18 を含む軽鎖可変領域 (L C V R) アミノ酸配列を具備する前記二重特異的抗体。

【請求項 143】

請求項 99 ~ 141 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、ヒト C D 20 に特異的に結合する前記第二の抗原結合性ドメインは、配列番号 2 を含む重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列、及び配列番号 18 を含む軽鎖可変領域 (L C V R) アミノ酸配列を具備する前記二重特異的抗体。

10

【請求項 144】

請求項 99 ~ 143 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、前記第一の抗原結合性ドメイン (A 1) は、三つの重鎖相補性決定領域 (H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3) を含み、ここで、

- (a) A 1 - H C D R 1 は、配列番号 12 のアミノ酸配列を含み、
- (b) A 1 - H C D R 2 は、配列番号 14 のアミノ酸配列を含み、
- (c) A 1 - H C D R 3 は、配列番号 16 のアミノ酸配列を含み、
- (d) A 1 - L C D R 1 は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、
- (e) A 1 - L C D R 2 は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、
- (f) A 1 - L C D R 3 は、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む

20

前記二重特異的抗体。

【請求項 145】

請求項 99 ~ 143 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、ヒト C D 20 に特異的に結合する前記第二の抗原結合性ドメインは (A 2) は、三つの重鎖相補性決定領域 (H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3) を含み、

30

ここで、

- (a) A 2 - H C D R 1 は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、
- (b) A 2 - H C D R 2 は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、
- (c) A 2 - H C D R 3 は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、
- (d) A 2 - L C D R 1 は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、
- (e) A 2 - L C D R 2 は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、
- (f) A 2 - L C D R 3 は、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む

前記二重特異的抗体

【請求項 146】

請求項 99 ~ 145 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、ヒト C D 3 に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメイン (A 1) は、三つの重鎖相補性決定領域 (A 1 - H C D R 1、A 1 - H C D R 2、A 1 - H C D R 3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (A 1 - L C D R 1、A 1 - L C D R 2、A 1 - L C D R 3) を含み、またヒト C D 20 に特異的に結合する前記第二の抗原結合性ドメインは (A 2) は、三つの重鎖相補性決定領域 (A 2 - H C D R 1、A 2 - H C D R 2、A 2 - H C D R 3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (A 2 - L C D R 1、A 2 - L C D R 2、A 2 - L C D R 3) を含み、

40

ここで、

- (a) A 1 - H C D R 1 は、配列番号 12 のアミノ酸配列を含み、
- (b) A 1 - H C D R 2 は、配列番号 14 のアミノ酸配列を含み、
- (c) A 1 - H C D R 3 は、配列番号 16 のアミノ酸配列を含み、

50

- (d) A1 - LCDR1 は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、
- (e) A1 - LCDR2 は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、
- (f) A1 - LCDR3 は、配列番号 24 のアミノ酸配列を含み
- (g) A2 - HCDR1 は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、
- (h) A2 - HCDR2 は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、
- (i) A2 - HCDR3 は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、
- (j) A2 - LCDR1 は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、
- (k) A2 - LCDR2 は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、
- (l) A2 - LCDR3 は、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む

前記二重特異的抗体。

10

【請求項 147】

請求項 99 ~ 138 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、前記第一の抗原結合性ドメインはヒト CD3 への結合について、三つの重鎖相補性決定領域 (A1 - HCDR1、A1 - HCDR2 及び A1 - HCDR3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (A1 - LCDR1、A1 - LCDR2 及び A1 - LCDR3) を含む基準の抗原結合タンパク質と競合し、ここで (i) A1 - HCDR1 は配列番号 12 のアミノ酸配列を含み、(ii) A1 - CDR2 は配列番号 14 のアミノ酸配列を含み、(iii) A1 - HCDR3 は配列番号 16 のアミノ酸配列を含み、(iv) A1 - LCDR1 は配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、(v) A1 - LCDR2 は配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、また (vi) A1 - CDR3 は配列番号 24 のアミノ酸配列を含む前記二重特異的抗体。

20

【請求項 148】

請求項 147 に記載の二重特異的抗体であって、前記第一の抗原結合性ドメインはヒト CD3 への結合について、(i) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (HCVR)、及び (ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LCVR) を含む基準の抗原結合性タンパク質と競合する前記二重特異的抗体。

【請求項 149】

請求項 99 ~ 138 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、前記第二の抗原結合性ドメインはヒト CD20 への結合について、三つの重鎖相補性決定領域 (A2 - HCDR1、A2 - HCDR2 及び A2 - HCDR3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (A2 - LCDR1、A2 - LCDR2 及び A2 - LCDR3) を含む基準の抗原結合タンパク質と競合し、ここで (i) A2 - HCDR1 は配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、(ii) A2 - CDR2 は配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、(iii) A2 - HCDR3 は配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、(iv) A2 - LCDR1 は配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、(v) A2 - LCDR2 は配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、また (vi) A2 - CDR3 は配列番号 24 のアミノ酸配列を含む前記二重特異的抗体。

30

【請求項 150】

請求項 149 に記載の二重特異的抗体であって、前記第二の抗原結合性ドメインはヒト CD20 への結合について、(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (HCVR)、及び (ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LCVR) を含む基準の抗原結合性タンパク質と競合する前記二重特異的抗体。

40

【請求項 151】

請求項 99 ~ 138 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、前記第一の抗原結合性ドメインはヒト CD3 への結合について、(i) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (HCVR)、及び (ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LCVR) を具備する基準の抗原結合性タンパク質と競合し、また前記第二の抗原結合性ドメインは、ヒト CD20 への結合について、(iii) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (HCVR)、及び配列番号 18 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LCVR) を具備する基準の抗原結合性タンパク質と競合する前記二重特異的抗体。

【請求項 152】

請求項 99 ~ 151 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、ヒト CD3 を発現

50

するヒト細胞、及びカニクイザル C D 3 を発現するカニクイザル細胞に結合する前記二重特異的抗体。

【請求項 1 5 3】

請求項 9 9 ~ 1 5 2 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、ヒト T 細胞またはカニクイザル T 細胞に結合する前記二重特異的抗体。

【請求項 1 5 4】

請求項 9 9 ~ 1 5 3 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、ヒト C D 2 0 を発現するヒト細胞に結合する前記二重特異的抗体。

【請求項 1 5 5】

請求項 9 9 ~ 1 5 4 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、ヒト B 細胞に結合する前記二重特異的抗体。

10

【請求項 1 5 6】

請求項 9 9 ~ 1 5 5 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、 1×10^{-12} M ~ 1×10^{-6} の EC_{50} 値で、C D 3 を発現するヒト T 細胞に結合する前記二重特異的抗体。

【請求項 1 5 7】

請求項 9 9 ~ 1 5 6 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、 1×10^{-9} M ~ 1×10^{-8} の EC_{50} 値で、C D 3 を発現するヒト T 細胞に結合する前記二重特異的抗体。

【請求項 1 5 8】

請求項 9 9 ~ 1 5 7 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、 1×10^{-12} M ~ 1×10^{-6} の EC_{50} 値で、C D 2 0 を発現するヒト B 細胞に結合する前記二重特異的抗体。

20

【請求項 1 5 9】

請求項 9 9 ~ 1 5 8 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、 1×10^{-9} M ~ 1×10^{-8} の EC_{50} 値で、C D 2 0 を発現するヒト B 細胞に結合する前記二重特異的抗体。

【請求項 1 6 0】

請求項 9 9 ~ 1 5 9 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、抗 C D 2 0 に媒介される細胞傷害性に対して耐性または不応性であるヒト B 細胞の、T 細胞に媒介された細胞傷害性を増強する前記二重特異的抗体。

30

【請求項 1 6 1】

請求項 9 9 ~ 1 6 0 の何れか 1 項に記載の二重特異的抗体であって、前記被験者への少なくとも約 0 . 0 1 m g / k g の用量での前記二重特異的抗体の単回投与は、前記被験者への前記二重特異的抗体の投与後約 2 日までに、前記被験者における B 細胞数を検出可能なレベル未満にまで低下させる前記二重特異的抗体。

【請求項 1 6 2】

請求項 1 6 1 に記載の二重特異的抗体であって、前記被験者への、少なくとも約 0 . 0 1 m g / k g の単一用量での前記二重特異的抗体の投与の少なくとも約 7 日後まで、前記 B 細胞の数は検出可能なレベル未満に維持される前記二重特異的抗体。

40

【請求項 1 6 3】

被験者における癌を治療または緩和するための医薬の製造における請求項 9 9 ~ 1 6 2 の何れか 1 項の二重特異的抗体の使用であって、前記二重特異的抗体は、ヒト C D 3 に結合する第一の抗原結合性ドメインと、ヒト C D 2 0 に結合する第二の抗原結合性ドメインと、前記第一及び第二の抗原結合性ドメインの各々に繋がれたキメラ F c ドメインを具備し、また前記癌を治療または緩和することは、(a) 前記被験者において腫瘍増殖を抑制すること、(b) 前記被験者において B 細胞溶解を媒介すること、(c) 前記被験者において B 細胞癌を治療すること、(d) 前記被験者において C D 2 0 発現が陽性の癌を治療すること、または (e) 前記被験者において C D 2 0 を発現するメラノーマ癌を治療することを包含する前記使用。

50

【請求項 164】

請求項 99 ~ 162 の何れか 1 項の二重特異的抗体を作製する方法であって、

a. 宿主細胞に、(i) 抗体の軽鎖をコードする核酸分子であって、該核酸分子は配列番号 18 を含む L C V R をコードするヌクレオチド配列、及び I g の定常 C_L 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、また前記抗体の L C V R 領域をコードする前記ヌクレオチド配列は I g の C_L 領域をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される核酸分子をトランスフェクトすることと、

b. 工程 (a) の前記宿主細胞に、(i) 前記抗体の第一の重鎖をコードする核酸分子であって、該核酸分子は配列番号 10 を含む H C V R をコードするヌクレオチド配列及び I g G のキメラ C_H 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでの前記 C_H 領域をコードするヌクレオチド配列は配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30 または配列番号 32 をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでの前記 H C V R をコードするヌクレオチド配列は、前記 C_H 領域をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される核酸分子と、(i i) 前記抗体の第二の重鎖をコードする核酸分子であって、該核酸分子は配列番号 2 を含む H C V R をコードするヌクレオチド配列及び I g G のキメラ C_H 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでの前記 C_H 領域をコードするヌクレオチド配列は配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30 及び配列番号 32 をコードするヌクレオチド配列を含み、前記 H C V R をコードするヌクレオチド配列は前記 C_H 領域をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される核酸分子をトランスフェクトすることと、

c. 前記宿主細胞内で (a) 及び (b) の核酸分子を共発現させることによって前記抗体を作製すること
を含んだ前記方法。

【請求項 165】

請求項 164 に記載の方法であって、更に、前記工程 (b) の宿主細胞を培養し、ここで前記抗体が細胞培養培地の中に分泌されることと、該抗体を前記細胞培養培地から単離することを含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2015 年 3 月 4 日に作成された A 0 0 1 5 W O 0 1 - S e q u e n c e . t x t という名称のファイル (83454 バイト) におけるコンピュータ読み取り可能な形式での配列表を含んでおり、これを本明細書の一部として本願に援用する。

【0002】

本発明は、C D 2 0 及び C D 3 抗原を標的とする二重特異的抗体、及び腫瘍殺滅方法に関する。本発明はまた、腫瘍治療のための抗体療法に関連して F c 結合から生じ得るエフェクター機能を低減及び / または制御する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

二重ターゲッティング抗体戦略は、多因子調節が治療上の有効性改善を目的とする複雑な疾患に適用されている。C D 2 0 は、成熟 B 細胞の細胞膜上に発現した非グリコシル化リントパク質である。C D 2 0 は、それが B 細胞非ホジキンリンパ腫 (N H L s) 及び他の B 細胞悪性腫瘍の 95% 以上で発現されるが、B 細胞前駆体、樹状細胞及び形質細胞上には存在しないので、B 細胞腫瘍関連抗原と考えられている。C D 2 0 を標的とすることにより癌を治療するための方法が当該分野で知られている。例えば、キメラ抗 C D 2 0 モノクローナル抗体のリツキシマブは、N H L、慢性リンパ球性白血病 (C L L) 及び小リンパ球性リンパ腫 (S L L) のような癌の治療に使用され、または使用が提案されている。抗 C D 2 0 抗体は、補体依存性細胞傷害 (C D C)、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) 及び / またはアポトーシス及び化学療法に対する感作の誘導により、C D 2 0 発現腫瘍細胞を死滅させると考えられているが、一部の患者は、抗 C D 2 0 療法に対する耐性を生じ、または不完全な応答を示すことが示されている (例えば、リツキシマブに

対する耐性)。

【0004】

CD3はT細胞受容体複合体(TCR)と会合してT細胞上に発現されるホモ二量体またはヘテロ二量体抗原であり、T細胞活性化に必要とされる。機能的CD3は、2~4の異なる鎖(イプシロン、ゼータ、デルタ、ガンマ)の二量体会合から形成される。CD3及びCD20等の標的抗原を結合できる二重特異的抗体は、標的抗原を発現する組織及び細胞に対するターゲッティングT細胞免疫応答を含む治療的用途のために提案されている。

【0005】

CD20結合性アーム及びCD3結合性アームを有する二重特異的抗体は、抗腫瘍活性を増強するために必要なクロストークを提供することができる。このような二重特異的抗体における第三の様式はFcドメインである。Fc結合特性の改変は、治療用抗体の抗腫瘍効力を更に増強することができる。

10

【0006】

免疫グロブリンFcドメインのその受容体に対する結合は、種々のシグナル伝達及び免疫応答をもたらす。これら様々な「エフェクター機能」、例えばCDC及びADCC等は、Gクラス免疫グロブリン(IgG)が、IgGのFabドメインと標的抗原との間で複合体を形成する結果であるのに対して、IgGのFcドメインはエフェクター細胞上のFc受容体に結合する。IgGの幾つかのエフェクター機能は抗原結合とは無関係であり、循環する血清レベル、及び障壁を横切ってIgを輸送する能力等の機能を実現する。他のエフェクター機能は、癌治療などの免疫療法において使用するために必須と考えられている。特にADCC機構は、ラスツズマブ(rastuzumab; 転移性乳癌)、及びリツキシマブ(非ホジキンリンパ腫)のような、既に市場に出されている治療用抗体の主要な抗腫瘍メカニズムの一つであると考えられている。

20

【0007】

現在の治療戦略は、低下したエフェクター機能(または低下したFcガンマ受容体結合)が、抗原の生物学的活性を中和または阻害することを目的とする抗体(例えば抗体ブロッカーまたは拮抗剤)、または下流の細胞シグナリングを活性化または開始することを目的とする抗体(例えば抗体アゴニスト)にとって有用であり得ることを典型的に示唆している。しかしながら、標的細胞の低下した細胞傷害性は、病気を治療するため、即ち、腫瘍細胞を破壊し、または主要増殖を阻害するためには有効でないことが予想されるので、エフェクター機能が低下した腫瘍ターゲッティング抗体の設計は、腫瘍の治療のためには直観に反するものである。

30

【0008】

本明細書に記載の1つの戦略は、腫瘍マーカーを特異的にターゲッティングすると共に、腫瘍特異的T細胞死滅をトリガーする二重特異性抗原と組み合わせた、差別的Fc受容体結合を利用する。抗体のFcドメインは、Fc受容体を有するT細胞、ナチュラルキラー細胞及びマクロファージ様細胞の望ましくない死滅を排除または低減させるために、Fc受容体結合を慎重に制御するように設計される。FcγRII受容体結合相互作用を含むが、FcγRIまたはFcγRIII相互作用を欠いたFc受容体との相互作用に関するユニークな結合パターンは、腫瘍ターゲッティングIg治療のためのためには当該技術分野において記載されていない。

40

【0009】

このように、二重特異的B細胞と、Fc受容体への結合性が低下したT細胞ターゲッティング抗体との組み合わせは、予想外に有益な治療特性をもたらす。CD3及びCD20の両方に結合する二重特異的抗体は、特異的CD20ターゲッティングが更に制御され且つ効率的な細胞障害性が望まれる臨床現場において、特に有用である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

50

第一の態様において、本発明は、ヒトCD3及びCD20に結合する改変されたFc結合ドメインを備えた二重特異的抗体を提供する。本発明のこの態様に従う抗体は、なかでも、例えばT細胞媒介性の死滅が、抗CD20腫瘍細胞のような特定の細胞型へのCD3媒介性のT細胞活性化を指令する二重特異的抗体の一部として有益であるか、または望ましい状況下において、CD3を発現するT細胞をターゲティングするため、及びT細胞活性化を刺激するために有用である。前記抗体は更に、免疫系の天然のレパートリーでは発見されていない特定のエフェクター機能を有するように操作される。

【0011】

本発明の典型的な抗CD3/CD20抗体が、本明細書の表1～8に列記されている。表1は、例示的な二重特異的抗体の重鎖可変領域(HCVR)及び軽鎖可変領域(LCVR)、並びに重鎖相補性決定領域(HCDR1、HCDR2及びHCDR3)及び軽鎖相補性決定領域(LCDR1、LCDR2及びLCDR3)のアミノ酸配列識別子を列記している。表2は、典型的な二重特異的抗体のHCVR、LCVR、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及びLCDR3をコードする核酸分子の配列識別子を記載している。表3は、HCVR、重鎖定常領域(CH)及びLCVRの組合せを含む、典型的な二重特異的抗体のアミノ酸配列識別子の組み合わせを記載している。表4は、典型的な二重特異的抗体のHCVR、重鎖定常領域(CH)及びLCVRの組み合わせをコードする核酸分子の、核酸配列識別子の組み合わせを記載している。

【0012】

表5は、本発明の重鎖例についてのアミノ酸配列の識別子を示しており、ここでの二重特異的抗体は、本発明のCHとペアになった表5のHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含んだHCVRを具備している。表6は、本発明の軽鎖例についてのアミノ酸配列識別子を別々に記載しており、ここでの二重特異的抗体は表6のLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含んだLCVRを具備している。

【0013】

本発明は、表1に列記したHCVRアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列、またはこれに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を含んだHCVRを具備する抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

【0014】

本発明はまた、表1に列記したLCVRアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列、またはこれに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を含んだLCVRを具備する抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

【0015】

本発明はまた、表1に列記した典型的な抗CD3/CD20抗体内に含まれるアミノ酸配列ペアを含んだHCVR及びLCVRアミノ酸配列ペア(HCVR/LCVR)を具備する抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。一定の実施形態において、HCVR/LCVRアミノ酸配列ペアは、配列番号2/18及び10/18(例えば、抗体1及び抗体2)からなる群から選択される。

【0016】

本発明はまた、表1に列記したHCDR1アミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列、またはこれに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を含んだ重鎖CDR1(HCDR1)を具備する抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

【0017】

本発明はまた、表1に列記したHCDR2アミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列、またはこれに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を含んだ重鎖CDR2(HCDR2)を具備する抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、表 1 に列記した H C D R 3 アミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列、またはこれに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を含んだ重鎖 C D R 3 (H C D R 3) を具備する抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、表 1 に列記した L C D R 1 アミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列、またはこれに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を含んだ軽鎖 C D R 1 (L C D R 1) を具備する抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

10

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、表 1 に列記した L C D R 2 アミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列、またはこれに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を含んだ軽鎖 C D R 2 (L C D R 2) を具備する抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明はまた、表 1 に列記した L C D R 3 アミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列、またはこれに対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % または少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を含んだ軽鎖 C D R 3 (L C D R 3) を具備する抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

20

【 0 0 2 2 】

本発明はまた、表 1 に列記した L C D R 3 アミノ酸配列の何れかとペアになった表 1 に列記した H C D R 3 アミノ酸配列を含んだ H C D R 3 及び L C D R 3 アミノ酸配列ペア (H C D R 3 / L C D R 3)、例えば配列番号 8 / 1 6 (例えば抗体 1 または抗体 2) からなる群から選択される H C D R 3 / L C D R 3 アミノ酸配列ペアを具備する抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 2 3 】

本発明はまた、表 1 に含まれる 6 つの C D R の組 (即ち、H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 - L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3) を含んだ抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。一定の実施形態において、アミノ酸配列の H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 - L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 の組は、配列番号 4 - 6 - 8 - 2 0 - 2 2 - 2 4 ; または 1 2 - 1 4 - 1 6 - 2 0 - 2 2 - 2 4 (例えば抗体 1 または抗体 2) である。

30

【 0 0 2 4 】

関連の実施形態において、本発明は、表 1 に列記した典型的な抗体を定義するような、H C V R / L C V R アミノ酸配列ペア内に含まれる 6 つの C D R の組 (即ち、H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 - L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3) を含んだ抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。例えば、本発明は、配列番号 2 / 1 8 (例えば抗体 1 または抗体 2) からなる群から選択される H C F R / L C V R アミノ酸配列ペア内に含まれる H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 - L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 アミノ酸配列の組を具備する抗体、またはその抗原結合性断片を含む。H C V R 及び L C V R アミノ酸配列内の C D R を同定するための方法及び技術は、当該技術分野で周知であり、本明細書に開示された特定の H C V R 及び / または L C V R アミノ酸配列内の C D R を同定するために用いることができる。C D R の境界を識別するために使用できる代表的な規則には、例えば、カバット (K a b a t) の定義、コチア (C h o t h i a) の定義、及び A b M 定義が含まれる。一般的には、カバット定義は配列変動性に基づいており、コチア定義は構造的ループ領域の位置に基づいており、また A b M 定義は、カバット及びコチアのアプローチの折衷である。例えば、カバット著「免疫学的に興味あるタンパク質の配列」国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド州 (1 9 9 1) ; A l - L a z i k a n i ら、J . M o l . B i o l . 2 7 3 : 9 2 7 ~ 9 4 8 (1 9 9 7) ; M a r t i n ら、P r

40

50

oc . Nat l . Acad . Sci . USA 86 : 9268 - 9272 (1989) を参照されたい。公共データベースもまた、抗体内の C D R 配列を同定するために利用可能である。

【 0025 】

本発明はまた、抗体またはその一部をコードする核酸分子を提供し、例えば、本発明は、表 1 に列挙された H C V R または L C V R のアミノ酸配列をコードする核酸分子を提供する；一定の実施形態において、この核酸分子は、表 2 に列記された H C F R / L C V R 核酸配列から選択されるポリヌクレオチド配列、またはこれと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的な類似配列を含んでいる。

10

【 0026 】

本発明はまた、表 1 に列記した H C D R 1 または H C D R 2 または H C D R 3 のアミノ酸配列をコードする核酸分子を提供する；一定の実施形態において、この核酸分子は、表 2 に列記された H C D R 1 または H C D R 2 または H C D R 3 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはこれと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的な類似配列を含んでいる。

【 0027 】

本発明はまた、表 1 に列記した L C D R 1 または L C D R 2 または L C D R 3 のアミノ酸配列の何れかをコードする核酸分子を提供する；一定の実施形態において、この核酸分子は、表 2 に列記された L C D R 1 または L C D R 2 または L C D R 3 核酸配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはこれと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的な類似配列を含んでいる。

20

【 0028 】

本発明はまた、H C V R をコードする核酸分子を提供し、ここでの H C V R は三つの C D R の組（即ち、H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3）を含み、ここでの H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 のアミノ酸配列は、表 1 に列記した典型的な抗 C D 3 抗体により定義される通りである。

【 0029 】

本発明はまた、L C V R をコードする核酸分子を提供し、ここでの L C V R は三つの C D R の組（即ち、L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3）を含み、ここでの L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 のアミノ酸配列は、表 1 に列記した典型的な抗 C D 3 抗体により定義される通りである。

30

【 0030 】

本発明はまた、H C V R 及び L C V R の両者をコードする核酸分子を提供し、ここでの H C V R は表 1 に列記した H C V R アミノ酸配列のアミノ酸配列を含み、またここでの L C V R は表 1 に列記した L C V R アミノ酸配列のアミノ酸配列を含んでいる。一定の実施形態において、前記核酸分子は表 2 に列記された H C V R 核酸配列、またはこれと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的な類似配列、及び表 2 に列記された L C V R 核酸配列、またはこれと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的な類似配列の何れかから選択されるポリヌクレオチド配列を含んでいる。本発明のこの態様に従う一定の実施形態において、前記核酸分子は H C V R 及び L C V R をコードし、ここでの H C V R 及び L C V R は両者共、表 1 に列記した同じ抗 C D 3 抗体に由来する。

40

【 0031 】

本発明はまた、表 2 に列記した重鎖定常領域（C H）のアミノ酸配列、または少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % の配列同一性を有するその実質的な類似配列を含む C H を備えた抗体またはその抗原結合性断片を提供す

50

る。

【 0 0 3 2 】

本発明はまた、表 2 に列記した重鎖定常領域 (C H) の核酸配列配列、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %または少なくとも 9 9 %の配列同一性を有するその実質的な類似配列から選択される核酸配列によりコードされる C H を備えた抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 3 3 】

本発明はまた、抗 C D 3 抗体の重鎖または軽鎖可変領域及び抗 C D 2 0 抗体の重鎖または軽鎖可変領域を含むポリペプチドを発現できる組換え発現ベクターを提供する。例えば、本発明は、上記で述べた核酸分子の何れか、即ち、表 1 及び表 2 に記載の H C V R、L C V R、及び / または C D R 配列、及び / または C H 配列の何れかをコードする核酸分子を備えた組換え発現ベクターを含むものである。また、本発明の範囲内には、このようなベクターが導入された宿主細胞、並びに該宿主細胞を前記抗体または抗体断片の産生を可能にする条件下で培養し、こうして産生された抗体及び抗体断片を回収することにより前記抗体またはその一部を産生する方法が含まれる。

【 0 0 3 4 】

別の態様において、本発明は、C D 3 及び C D 2 0 に特異的に結合する治療的有効量の組換えヒト抗体またはその断片であって、該抗体はキメラ F c ドメインを含むものと、薬学的に受容可能なキャリアを提供する。関連の態様において、本発明は、抗 C D 3 / C D 2 0 抗体と、第 2 の治療剤との組み合わせである組成物を特徴とする。一実施形態において、前記第二の治療剤は、有利には、抗 C D 3 / C D 2 0 抗体と併用される任意の薬剤である。抗 C D 3 / C D 2 0 抗体と有利に組み合わせ得る典型的な薬剤には、限定されるものではないが、C D 3 シグナル伝達に結合及び / または活性化する薬剤 (他の抗体またはその抗原結合性断片等を含む)、及び / または C D 3 に直接結合しないが、それでも免疫細胞を活性化し、または免疫細胞活性化を刺激し、または腫瘍の殺傷を高める薬剤が含まれる。本発明の抗 C D 3 抗体を含む追加の併用療法、及び併用製剤が本明細書の他の箇所に開示される。

【 0 0 3 5 】

本発明の別の態様に従えば、本発明は、C D 3 及び標的抗原に結合する二重特異性の抗体結合性分子を提供し、ここでの前記分子は低下したエフェクター機能を有するキメラ F c ドメインを具備する。一定の実施形態において、前記分子は本明細書に記載するキメラ F c ドメインを具備する。一定の典型的な実施形態に従えば、前記二重特異的抗原結合性分子は C D 3 及び C D 2 0 に結合する ; このような二重特異的抗原結合性分子はまた、本明細書では「抗 C D 3 / 抗 C D 2 0 二重特異的分子」と称する。抗 C D 3 / 抗 C D 2 0 二重特異的分子の抗 C D 2 0 部分は、C D 2 0 を発現する腫瘍細胞 (例えば、B 細胞腫瘍) をターゲティングするために有用であり、前記二重特異的分子の抗 C D 3 部分は T 細胞を活性化するために有用である。腫瘍細胞上の C D 2 0 及び T 細胞上の C D 3 の同時結合は、活性化された T 細胞による標的腫瘍細胞の殺傷 (細胞溶解) を媒介し、またキメラの F c ドメインと結合するエフェクター細胞によって促進される。従って、本発明の抗 C D 3 / 抗 C D 2 0 二重特異的分子は、特に、C D 2 0 を発現する腫瘍 (例えば、リンパ腫及びメラノーマ) に関連し、または該腫瘍によって引き起こされる疾患及び障害を治療するために有用である。

【 0 0 3 6 】

本発明の抗 C D 3 / 抗 C D 2 0 二重特異的分子は、C D 2 0 陽性腫瘍を退縮させるための方法を提供する。従って、本発明は、被験者において B 細胞癌を治療するための方法を提供するものであり、該方法は治療量の本発明の抗 C D 3 / 抗 C D 2 0 二重特異的分子を投与することを含み、前記量は、前記被験者において腫瘍の負担を軽減し、腫瘍退縮を生じさせ、または腫瘍発生を減少させるのに十分な量である。

【 0 0 3 7 】

本発明の抗 C D 3 / 抗 C D 2 0 二重特異的分子は更に、C D 2 0 陽性 (即ち、C D 2 0

を発現する)のメラノーマを抑制または退縮させる方法を提供する。従って、本発明は、被験者におけるCD20陽性メラノーマを治療する方法を提供するものであり、該方法は、治療量的本発明の抗CD3/抗CD20二重特異的分子を投与することを含み、前記量は、前記被験者において腫瘍の負担を軽減し、腫瘍退縮を生じさせ、または腫瘍発生を減少させるのに十分な量である。

【0038】

別の態様において、本発明は、被験者における癌を治療または改善するための二重特異的抗体の使用を提供するものであり、ここでの前記二重特異的抗体は、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメインと、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメインと、前記第一及び第二の抗原結合性ドメインの各々に繋がれたキメラFcドメインを具備し、また前記癌を治療または改善することは、(a)前記被験者において腫瘍増殖を抑制することと、(b)前記被験者においてB細胞溶解を媒介することと、(c)前記被験者においてB細胞癌を治療することと、(d)前記被験者においてCD20発現陽性の癌を治療すること、または(e)前記被験者においてCD20を発現するメラノーマを治療することを含んでいる。

10

【0039】

別の態様において、本発明は、被験者における腫瘍増殖を抑制するための二重特異的抗体の使用を提供するものであり、ここでの前記二重特異的抗体は、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメイン、並びに第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラFcドメインを含んでいる。幾つかの場合において、腫瘍増殖を抑制することは、(a)被験者における腫瘍増殖を阻害すること、(b)被験者における腫瘍のサイズを減少させること、または(c)被験者における腫瘍の数を減少させることを包含する。

20

【0040】

別の態様において、本発明は、被験者においてB細胞溶解を媒介するための二重特異的抗体の使用を提供するものであり、ここでの前記二重特異的抗体は、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメイン、並びに前記第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラFcドメインを含んでいる。幾つかの場合において、前記B細胞はプレBリンパ球、成熟Bリンパ球、またはB細胞非ホジキンリンパ腫細胞である。

30

【0041】

別の態様において、本発明は、被験者におけるB細胞癌を治療するための二重特異的抗体の使用を提供するものであり、ここでの前記二重特異的抗体は、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメイン、並びに前記第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラFcドメインを含んでいる。幾つかの場合において、前記B細胞癌は、濾胞性リンパ腫、B細胞慢性リンパ球性白血病、B細胞リンパ芽球性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、瀰漫性大細胞型B細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病及びバーキットリンパ腫からなる群から選択される。幾つかの場合において、前記被験者は(a)抗CD20単一特異性療法単独、または(b)リツキシマブ単剤療法に対して抵抗性であるか、または不完全に反応する腫瘍に罹患している。幾つかの場合、前記被験者は、二重特異的抗体の投与の少なくとも1日ないし1年前に、抗CD20単一特異性抗体療法を受けている。幾つかの場合、前記抗CD20単一特異性療法は、抗CD20単一特異性抗体を含むか、または該抗体からなる。幾つかの場合において、前記抗CD20単一特異性抗体はリツキシマブである。

40

【0042】

別の態様において、本発明は、被験者においてB細胞癌を治療するための二重特異的抗体の使用を提供するものであり、これは(a)抗CD20単一特異性療法単独に対して抵抗性、または不完全に反応する癌に罹患している被験者を選択することと、(b)前記被験者に対して、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒトCD20に結合す

50

る第二の抗原結合性ドメイン、並びに前記第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラFcドメインを具備する治療量の二重特異的抗体を投与することを含んでいる。

【0043】

幾つかの場合において、前記被験者は、抗CD20単一特異性療法に対して抵抗性であるか、耐性であるか、または不完全に反応する腫瘍を有することに基づいて選択される。幾つかの場合に、抗CD20単一特異性療法は、抗CD20単一特異性抗体を含むか、または該抗体からなる。幾つかの場合に、前記抗CD20単一特異性抗体はリツキシマブである。幾つかの実施形態において、前記B細胞癌はリンパ腫である。幾つかの場合、該リンパ腫は非ホジキンリンパ腫(NHL)である。幾つかの場合、前記B細胞癌は慢性リンパ性白血病(CLL)である。

10

【0044】

別の態様において、本発明は、被験者においてB細胞癌を治療するための二重特異的抗体の使用を提供するものであり、ここでの二重特異的抗体は、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメイン、並びに前記第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラFcドメインを含んでおり、また前記二重特異的抗体は、前記被験者において腫瘍の負担を軽減し、腫瘍退縮を生じさせ、腫瘍増殖を阻害し、または腫瘍発生を減少させるのに十分な量で投与される。

【0045】

幾つかの場合において、前記B細胞癌は、濾胞性リンパ腫、B細胞慢性リンパ球性白血病、B細胞リンパ芽球性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、瀰漫性大細胞型B細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病及びパーキットリンパ腫からなる群から選択される。幾つかの場合において、前記被験者は、抗CD20単一特異性療法単独に対して抵抗性であるか、または不完全に反応する腫瘍に罹患している。幾つかの場合、前記被験者は、リツキシマブ単剤療法に対して抵抗性であるか、または不完全に反応する腫瘍に罹患している。幾つかの場合、前記被験者は、二重特異的抗体の投与の少なくとも1日前ないし1年前に、抗CD20単一特異性抗体療法を受けている。幾つかの場合、前記抗CD20単一特異性抗体療法は、抗CD20単一特異性抗体を含むか、または該抗体からなる。幾つかの場合において、前記抗CD20単一特異性抗体はリツキシマブである。幾つかの場合において、前記被験者において腫瘍の負担を軽減し、腫瘍の退縮を生じさせ、腫瘍増殖を阻害し、または腫瘍の発生を減少させるために十分な前記量は、約0.001mg/kg~約1mg/kgである。幾つかの場合において、前記被験者において腫瘍の負担を軽減し、腫瘍の退縮を生じさせ、腫瘍増殖を阻害し、または腫瘍の発生を減少させるために十分な前記量は、約0.4mg/kgである。

20

30

【0046】

別の態様において、本発明は、被験者において、CD20発現について陽性の癌を治療するための二重特異的抗体の使用を提供するものであり、該使用は(a)癌及び/または腫瘍に罹患している被験者を選択することと、(b)前記被験者から1以上の生物学的サンプルを収集することと、(c)前記1以上のサンプルにおいてCD20を発現する癌細胞または腫瘍細胞を同定することと、(b)前記被験者に対して、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメイン、並びに前記第一及び第二の抗原結合性ドメインのそれぞれに繋がれたキメラFcドメインを具備する治療量の二重特異的抗体を投与することを含んでいる。

40

【0047】

幾つかの場合において、前記被験者は、抗CD20療法に対して抵抗性であるか、耐性であるか、または不完全に反応する癌または腫瘍を有することに基づいて選択される。幾つかの場合に、前記被験者は、残留癌を有することに基づいて選択される。幾つかの場合において、前記抗CD20療法は、抗CD20単一特異性抗体を含み、または該抗体からなる。幾つかの場合において、前記抗CD20単一特異性抗体は、リツキシマブである。

50

幾つかの場合において、前記癌はリンパ腫または白血病である。幾つかの場合において、前記リンパ腫は、濾胞性リンパ腫、B細胞慢性リンパ球性白血病、B細胞リンパ芽球性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、瀰漫性大細胞型B細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病及びパーキットリンパ腫からなる群から選択される。幾つかの場合において、前記白血病は、B細胞慢性リンパ球性白血病（CLL）である。

【0048】

別の態様において、本発明は、被験者において、CD20を発現するメラノーマ癌を治療するための二重特異的抗体の使用を提供するものであり、これはヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメインと、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメインと、前記第一及び第二の抗原結合性ドメインの各々に繋がれたキメラFcドメインを具備する治療量の二重特異的抗体を投与することを含んでなり、ここでの前記量は腫瘍の負担を軽減し、腫瘍増殖を阻害し、または腫瘍の腫瘍の発生を減少させるために十分である。

10

【0049】

本発明のこの態様による二重特異的抗原結合性分子は、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメインと、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメインと、前記第一及び第二の抗原結合性ドメインの各々に繋がれたキメラFcドメインを具備する。本発明は、抗CD3/抗CD20二重特異的分子（例えば二重特異的抗体）を含み、ここでの各抗原結合性ドメインは、軽鎖可変領域（LCVR）とペアになった重鎖可変領域（HCVR）を具備する。本発明の一定の典型的な実施形態において、前記抗CD3抗原結合性ドメイン及び前記抗CD20抗原結合ドメインは、それぞれ共通のLCVRとペアになった、異なる別個のHCVRを含んでいる。例えば、本明細書の実施例2に示すように、二重特異的抗体は、CD3に特異的に結合する第一の抗原結合性ドメインであって、抗CD3抗体由来のHCVR/LCVRペアを具備する第一の抗原結合性ドメインと；CD20に特異的に結合する第二の抗原結合性ドメインであって、CD3抗体由来のLCVR（例えば、前記CD3抗原結合性ドメインに含まれる同じLCVR）とペアになった抗CD20抗体由来のHCVRを含む第二の抗原結合性ドメインを含むように構築される。換言すれば、本明細書で開示される典型的な分子において、抗CD20抗体由来のHCVRと抗CD3抗体由来のLCVRとのペアリングは、CD20に特異的に結合するが、CD3には結合しない抗原結合性ドメインを創成する。このような実施形態では、前記第一及び第二の抗原結合性ドメインは、異なる抗CD3及び抗CD20・HCVRを含むが、共通の抗CD3・LCVRを共有する。

20

30

【0050】

本発明は、抗CD3/抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここでのCD3に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインは、表1または表2に記載のHCVRのアミノ酸配列の何れかを含んでいる。CD3に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインはまた、表1または表2に記載のLCVRアミノ酸配列の何れかを含むことができる。一定の実施形態に従えば、CD3に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインは、表1または表2に記載のHCVR/LCVRアミノ酸配列ペアの何れかを含む。本発明はまた、抗CD3/抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここではCD3に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインは、表1または表2に記載の重鎖CDR1-CDR2-CDR3アミノ酸配列の何れか、及び/または表1または表2に記載の軽鎖CDR1-CDR2-CDR3アミノ酸配列の何れかを含んでいる。

40

【0051】

一定の実施形態によれば、本発明は、抗CD3/抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここでのCD3に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号10を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する重鎖可変領域（HCVR）を具備する。

【0052】

50

一定の実施形態に従えば、本発明は、抗CD3 / 抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここではCD3に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号18を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する軽鎖可変領域(LCVR)を具備する。

【0053】

本発明はまた、抗CD3 / 抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここではCD3に特異的に結合する第一の抗原結合性ドメインは、配列番号10 / 18からなる群から選択されるHCVR及びLCVR(HCVR / LCVR)アミノ酸配列ペアを含んでいる。

10

【0054】

本発明はまた、抗CD3 / 抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここでのCD3に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号16を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するそれと実質的に類似の配列を有する重鎖CDR3(HCDR3)ドメイン；及び配列番号24を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する軽鎖CDR3(LCDR3)ドメインを具備する。

【0055】

一定の実施形態において、CD3に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号16 / 24を含むHCDR3 / LCDR3アミノ酸配列ペアを含んでいる。

20

【0056】

本発明はまた、抗CD3 / 抗CD20二重特異的抗原結合性分子を提供するものであり、ここでCD3に特異的に結合する前記第一の抗原結合性ドメインは、配列番号12を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を有する重鎖CDR1(HCDR1)ドメイン；配列番号14を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する重鎖CDR2(HCDR2)ドメイン；配列番号20を含むアミノ酸配列、またはその少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に類似の配列を有する軽鎖CDR1(LCDR1)ドメイン；及び配列番号22を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する軽鎖CDR2(LCDR2)ドメインを具備している。

30

【0057】

一定の非限定的で典型的な本発明の抗CD3 / 抗CD20二重特異的抗原結合性分子は、それぞれが配列番号12 - 14 - 16 - 20 - 22 - 24からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3ドメインを含んだ、CD3に特異的に結合する第一の抗原結合性ドメインを具備する。

40

【0058】

本発明はまた、抗CD3 / 抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここでのCD20に特異的に結合する第二の抗原結合ドメインは、配列番号2を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する重鎖可変領域(HCVR)を具備する。

【0059】

本発明はまた、抗CD3 / 抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここでのCD20に特異的に結合する第二の抗原結合性ドメインは、配列番号18を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも

50

99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する軽鎖可変領域(LCVR)を具備する。本発明はまた、抗CD3/抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここでのCD20に特異的に結合する前記第二の抗原結合性ドメインは、配列番号75を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する軽鎖可変領域(LCVR)を具備する。

【0060】

本発明はまた、抗CD3/抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここでのCD20に特異的に結合する第二の抗原結合性ドメインは、配列番号2/18または配列番号2/75を含むアミノ酸配列を有するHCVR及びLCVR(HCVR/LCVR)アミノ酸配列ペアを具備する。

10

【0061】

本発明はまた、抗CD3/抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここでのCD20に特異的に結合する第二の抗原結合性ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する重鎖CDR3(HCDR3)ドメイン；及び配列番号24を含むアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する軽鎖CDR3(LCDR3)ドメインを具備する。

20

【0062】

一定の実施形態において、CD20に特異的に結合する前記第二の抗原結合性ドメインは、配列番号8/24を含むHCDR3/LCDR3アミノ酸配列ペアを具備する。

【0063】

本発明はまた、抗CD3/抗CD20二重特異的分子を提供するものであり、ここでのCD20に特異的に結合する第二の抗原結合性ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する重鎖CDR1(HCDR1)ドメイン；配列番号6のアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する重鎖CDR2(HCDR2)ドメイン；配列番号20のアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する軽鎖CDR1(LCDR1)ドメイン；及び配列番号22のアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的な類似配列を有する軽鎖CDR2(LCDR2)ドメインを具備する。

30

【0064】

本発明の、非限定的で典型的な抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子は、それぞれが配列番号4-6-8-20-22-24(例えば、抗体1または抗体2)からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3ドメインを含む、CD20に特異的に結合する第二の抗原結合性ドメインを具備する。

40

【0065】

一実施形態において、本発明の抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子は、ヒトCD3に特異的に結合し、且つ三つの重鎖相補性決定領域(A1-HCDR1、A1-HCDR2、A1-HCDR3)及び三つの軽鎖相補性決定領域(A1-LCDR1、A1-LCDR2、A1-LCDR3)を具備する第一の抗原結合性ドメイン(A1)と；ヒトCD20に特異的に結合し、且つ三つの重鎖相補性決定領域(A2-HCDR1、A2-HCDR2、A2-HCDR3)及び三つの軽鎖相補性決定領域(A2-LCDR1、A2-LCDR2、A2-LCDR3)を具備する第二の抗原結合性ドメイン(A2)を含み；ここで、(a)A1-HCDR1は配列番号12のアミノ酸配列を含み；(b)

50

A 1 - H C D R 2 は配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含み；(c) A 1 - H C D R 3 は配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含み；(d) A 1 - L C D R 1 は配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含み；(e) A 1 - L C D R 2 は配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含み；(f) A 1 - L C D R 3 は配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含み；(g) A 2 - H C D R 1 は配列番号 4 のアミノ酸配列を含み；(h) A 2 - H C D R 2 は配列番号 6 のアミノ酸配列を含み；(i) A 2 - H C D R 3 は配列番号 8 のアミノ酸配列を含み；(j) A 2 - L C D R 1 は配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含み；(k) A 2 - L C D R 2 は配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含み；(l) A 2 - L C D R 3 は配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 6 】

関連する態様において、本発明は、抗 C D 3 / 抗 C D 2 0 二重特異的抗原結合性分子を含み、ここでの C D 2 0 に特異的に結合する前記第二の抗原結合性ドメインは、配列番号 2 / 1 8 の重鎖及び軽鎖可変領域 (H C V R / L C V R) 内に含まれる重鎖及び軽鎖 C D R ドメインを具備する。

10

【 0 0 6 7 】

別の態様において、本発明は、本明細書に開示した抗 C D 3 / 抗 C D 2 0 二重特異的抗原結合性分子の H C V R、L C V R または C D R 配列の何れかをコードする核酸分子を提供するものであり、これには本明細書の表 2、7 及び 8 に記載のポリヌクレオチド配列を含む核酸分子、並びに表 2、7 及び 8 に記載のポリヌクレオチド配列のうちの二つの核酸分子をそれらの何れかの機能的組合せまたは配置で具備する核酸分子が含まれる。本発明の核酸を担持する組換え発現ベクター、及びこのようなベクターがその中に導入された宿主細胞もまた、該宿主細胞を前記抗体の産生を可能にする条件下で培養することと、産生された抗体を回収することによる抗体を製造する方法と共に、本発明に包含される。

20

【 0 0 6 8 】

本発明は、抗 C D 3 / 抗 C D 2 0 二重特異的抗原結合性分子を含むものであり、ここでは、上記で述べた C D 3 に特異的に結合する抗原結合性ドメインの何れかが、上記で述べた C D 2 0 に特異的に結合する抗原結合性ドメインの何れかと組み合わせられ、結合され、または会合されて、C D 3 及び C D 2 0 に結合する二重特異的抗原結合性分子を形成する。

【 0 0 6 9 】

別の態様において、本発明は、ヒト C D 3 に結合する第一の抗原結合性ドメイン、ヒト C D 2 0 に結合する第二の抗原結合性ドメイン、並びに前記第一及び第二の抗原結合性ドメインの各々に繋がれた F c ドメインを具備した二重特異的抗体を提供する。関連の態様において、前記二重特異的抗体は、ヒト F c γ R I I A 及びヒト F c γ R I I B に結合することができる。本発明は、ヒト F c γ R I I A 及びヒト F c γ R I I B に優先的に結合し、ヒトの F c γ R I またはヒトの F c γ R I I I には結合親和性を僅かしか、または全く示さない抗 C D 3 / 抗 C D 2 0 二重特異的抗原結合性分子を提供する。一つの態様において、前記二重特異的抗体は、インビトロアッセイで測定したときに、ヒト F c γ R I I B、ヒトの F c γ R I 及び / またはヒトの F c γ R I I I に対する結合についてよりも高い親和性で、ヒト F c γ R I I A に結合することができる。本発明の二重特異的抗体は、インビトロアッセイで測定したときに、該抗体がヒト F c γ R I またはヒト F c γ R I I I に結合するよりも高い親和性で、ヒト F c γ R I I A 及びヒト F c γ R I I B に結合することができる。幾つかの実施形態では、前記抗体は、ヒト F c γ R I I A 及びヒト F c γ R I I B の両方に結合し、且つインビトロアッセイで測定したときに、ヒト F c γ R I 及びヒト F c γ R I I I の各々に対して 1 μ M K_D 未満の結合親和性を示す。

30

40

【 0 0 7 0 】

他の態様において、本発明は、各々がキメラ F c ドメインを備えた第一及び第二の重鎖ポリペプチドを含む二重特異的抗体を提供し、ここでの前記第一の重鎖ポリペプチドはヒト C D 3 に結合する抗原結合性ドメインを具備し、また前記第二の重鎖ポリペプチドはヒト C D 2 0 に結合する第二の抗原結合性ドメインを具備する。

【 0 0 7 1 】

50

他の実施形態において、前記抗体は、インビトロアッセイで測定したときに、ヒトFcγRIIBに対するその結合に比較して、ヒトFcγRIIAについてより高い結合親和性、即ちより強い結合親和性を示す。更に他の実施形態において、前記抗体はヒトFcγRIIAに結合し、インビトロアッセイで測定したときに、ヒトFcγRIIBに対するその結合に比較してより低い K_D 値を示す。幾つかの実施形態において、前記抗体は25においてヒトFcγRIIAに結合し、インビトロアッセイで測定したときに10~30μMの K_D 値を有する。幾つかの実施形態において、前記抗体は25においてヒトFcγRIIBに結合し、インビトロアッセイで測定したときに100~250μMの K_D 値を有する。

【0072】

10

別の態様において、前記抗体はインビトロアッセイで測定したときに、ヒトFcγRIに対して検出可能な結合親和性を僅かしか、または全く示さない。幾つかの態様において、前記抗体は、ヒトFcγRIIIに対する検出可能な結合親和性を、僅かしか、または全く示さない。

【0073】

幾つかの実施形態において、前記インビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴アッセイである。

【0074】

幾つかの実施形態において、前記抗体は、インビトロ細胞傷害性アッセイで測定したときに、野生型Fcドメインを含む抗体に比較して低下した抗体依存性細胞障害性(ADCC)を示す。

20

【0075】

幾つかの実施形態において、前記抗体は無視できる抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を示し、または検出可能なADCCを示さない。

【0076】

幾つかの実施形態において、前記抗体は、インビトロ細胞傷害性アッセイで測定したときに、野生型Fcドメインを含む抗体と比較して減少した補体依存性細胞傷害性(CDC)を示す。

【0077】

幾つかの実施形態において、前記抗体は、インビトロアッセイでの細胞溶解の測定により決定したときに、50%未満の細胞傷害性を示す。

30

【0078】

幾つかの実施形態において、前記抗体は、無視できる補体依存性細胞傷害性(CDC)を示し、または検出可能なCDCを示さない。

【0079】

幾つかの実施形態において、前記抗体は、野生型Fcドメインを含む抗体と比較して、NK細胞またはマクロファージのようなFc受容体を有する細胞の減少したT細胞媒介性死滅を誘導する。

【0080】

一定の実施形態において、前記抗体は、野生型Fcドメインを備えた抗体に比較して、NK細胞またはマクロファージのようなFc受容体を有する細胞により媒介される減少したT細胞死滅を誘導する。

40

【0081】

幾つかの実施形態において、インビトロアッセイにおける K_D の測定により決定されたときに、前記抗体はヒトFcγRIIAに対する結合親和性を示し、これはヒトFcγRIIBに対するその結合親和性よりも強く、これはヒトFcγRIに対する結合親和性よりも強く、これはヒトFcγRIIIに対するその結合親和性よりも強いまたは同等である。他の実施形態において、前記抗体は、インビトロアッセイで測定したときに次の順序での結合親和性を示す：ヒトFcγRIIA>ヒトFcγRIIB>ヒトFcγRI>ヒトFcγRIII。

50

【 0 0 8 2 】

幾つかの実施形態において、インビトロアッセイにおける K_D の測定により決定されたときに、前記抗体はヒト F c γ R I I A に対する結合親和性を示し、これはヒト F c γ R I I B に対するその結合親和性よりも強く、これはヒト F c γ R I I I に対する結合親和性よりも強く、これはヒト F c γ R I に対するその結合親和性よりも強いまたは同等である。他の実施形態において、前記抗体は、インビトロアッセイで測定したときに次の順序での結合親和性を示す：ヒト F c γ R I I A > ヒト F c γ R I I B > ヒト F c γ R I I I > = ヒト F c γ R I 。

【 0 0 8 3 】

幾つかの実施形態において、ヒト F c γ R I I I は、ヒト F c γ R I I I A またはヒト F c γ R I I I B である。

【 0 0 8 4 】

幾つかの実施形態において、前記キメラ F c ドメインはキメラヒンジを備えている。

【 0 0 8 5 】

別の態様において、本発明は、第一の抗原結合性ドメイン、第二の抗原結合性ドメイン、及びキメラ重鎖の定常 (C H) 領域を備えた二重特異的抗体を提供し、ここで (a) 前記第一の抗原結合性ドメインは C D 3 に結合し、(b) 前記第二の抗原結合性ドメインは C D 2 0 に結合する。本発明の一定の態様において、前記キメラ C H 領域は、インビトロアッセイで測定したときに、野生型 C H 領域を備えた抗体と比較して、より高い、即ちより強い親和性で、ヒト F c γ R I I A 及びヒト F c γ R I I B に結合する。更に別の態様において、キメラ C H は、インビトロアッセイで測定したときに、野生型の C H 領域を備えた抗体と比較して、より低い、またはより弱い親和性で、ヒト F c γ R I 及びヒトの F c γ R I I I に結合する。

【 0 0 8 6 】

本発明は、キメラヒンジ領域を含む二重特異的抗体を提供する。幾つかの態様において、前記キメラヒンジ領域は、位置 2 1 6 ~ 2 3 6 (E U 番号付け) のアミノ酸配列残基を含む。キメラヒンジが位置 2 2 8 ~ 2 3 6 (E U 番号付け) のヒト I g G 2 下側ヒンジ部のアミノ酸配列 P C P A P P V A (配列番号 5 2) を含んだ、本発明の二重特異的抗体が構築される。一定の実施形態において、本発明の二重特異的抗体はキメラヒンジを含み、また該キメラヒンジの上側ヒンジ部は、I g G 1 上側ヒンジ部における位置 2 1 6 ~ 2 2 7 (E U 番号付け) のアミノ酸残基を含む。他の実施形態では、本発明の二重特異的抗体はキメラヒンジを含み、該キメラヒンジの上側ヒンジ部は、I g G 4 の上側ヒンジ部における位置 2 1 6 ~ 2 2 7 (E U 番号付け) のアミノ酸残基を含む。

【 0 0 8 7 】

一実施形態において、前記二重特異的抗体は、キメラヒンジのアミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P A P P V A (配列番号 5 3) を含む。別の実施形態において、前記二重特異的抗体は、キメラヒンジアミノ酸配列 E S K Y G P P C P P C P A P P V A (配列番号 5 4) を含む。一定の実施形態において、前記二重特異的抗体は、位置 2 3 7 ~ 3 4 0 (E U 番号付け) のヒト I g G 4 · C H 2 ドメインアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、前記二重特異的抗体は、ヒト I g G 1 · C H 3 ドメインまたはヒト I g G 4 · C H 3 ドメインに由来する C H 3 ドメインを具備する。さらに他の実施形態において、前記二重特異的抗体は、ヒト I g G 1 · C H 1 ドメイン及びヒト I g G 1 · C H 3 ドメインを具備する。より多くの実施形態において、前記二重特異的抗体は、ヒト I g G 4 · C H 1 ドメイン及びヒト I g G 4 · C H 3 ドメインを具備する。

【 0 0 8 8 】

本発明の一態様は、キメラ定常重鎖領域を備えた二重特異的抗体を作製する方法を提供するものであり、該方法は、(a) C D 3 抗原に結合できる第一の軽鎖をコードする核酸分子で宿主細胞をトランスフェクトし、前記核酸分子は前記第一の軽鎖の V L 領域をコードするヌクレオチド配列、及び前記 I g の定常 C L 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで選択された抗原特異性抗体の前記 V L 領域をコードするヌクレオチド配列及

10

20

30

40

50

び I g の C L 領域をコードする前記ヌクレオチド配列は動作可能に一緒に連結されることと； (b) 工程 (a) の前記宿主細胞に、 C D 3 抗原に結合できる前記抗体の第一の重鎖をコードする核酸分子をトランスフェクトし、前記核酸分子はヒト I g の V H 領域をコードするヌクレオチド配列及びキメラ定常 C H 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでの I g の V H 領域をコードするヌクレオチド配列及び C H 領域をコードするヌクレオチド配列が動作可能に一緒に連結され；ここでの前記 C H 領域は、前記第二の C H 3 のプロテイン A への結合を低下または排除する C H 3 ドメインにおける 1 以上のアミノ酸修飾をコードすることと； (c) 工程 (a) の前記宿主細胞に、 C D 2 0 抗原に結合できる前記抗体の第二の重鎖をコードする核酸分子をトランスフェクトし、前記核酸分子はヒト I g の V H 領域をコードするヌクレオチド配列及びキメラ C H 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでの前記 I g の V H 領域をコードするヌクレオチド配列および C H 領域をコードするヌクレオチド配列が動作可能に一緒に連結されることと；及び (c) 前記宿主細胞において (a) 及び (b) の前記核酸分子を共発現させることによって、前記抗体を作製することを含んでいる。

10

20

30

【 0 0 8 9 】

一実施形態において、本発明は、二重特異的抗体を作製する方法において： (a) 宿主細胞に、 (i) 抗体の軽鎖をコードする核酸分子であって、該核酸分子は配列番号 1 8 を含む L C V R をコードするヌクレオチド配列、及び I g の定常 C_L 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、また前記抗体の L C V R 領域をコードする前記ヌクレオチド配列は I g の C_L 領域をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される核酸分子をトランスフェクトすることと、 (b) 工程 (a) の前記宿主細胞に、 (i) 前記抗体の第一の重鎖をコードする核酸分子であって、該核酸分子は配列番号 1 0 を含む H C V R をコードするヌクレオチド配列及び I g G のキメラ C_H 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでの前記 C_H 領域をコードするヌクレオチド配列は配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0 または配列番号 3 2 をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでの前記 H C V R をコードするヌクレオチド配列は、前記 C_H 領域をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される核酸分子と、 (i i) 前記抗体の第二の重鎖をコードする核酸分子であって、該核酸分子は配列番号 2 を含む H C V R をコードするヌクレオチド配列及び I g G のキメラ C_H 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでの前記 C_H 領域をコードするヌクレオチド配列は配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 0 及び配列番号 3 2 をコードするヌクレオチド配列を含み、前記 H C V R をコードするヌクレオチド配列は前記 C_H 領域をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される核酸分子をトランスフェクトすることと、 (c) 前記宿主細胞内で (a) 及び (b) の核酸分子を共発現させることによって前記抗体を作製することによる方法を提供する。幾つかの場合に、当該方法は更に、工程 (b) の前記宿主細胞を培養する工程（ここで抗体が細胞培地中に分泌される）、及びこの細胞培地から前記抗体を単離する工程を含む。

【 0 0 9 0 】

幾つかの態様において、前記二重特異的抗体を作製する方法は、任意に、前記工程 (a) の宿主細胞に、 C D 2 0 抗原に結合できる第二の軽鎖をコードする核酸分子をトランスフェクトすることを含み、該核酸分子は第二の軽鎖の V L 領域をコードするヌクレオチド配列及び I g の定常 C L 領域をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでの前記第二の軽鎖の V L 領域をコードするヌクレオチド配列及び前記 I g の C L 領域をコードするヌクレオチド配列は動作可能に一緒に連結される。

40

【 0 0 9 1 】

幾つかの実施形態において、前記第一の重鎖は、 H 9 5 R 修飾 (I M G T エキソン番号付けによる； E U 番号付けによる H 4 3 5 R) を含んだ C H 3 領域を具備する。別の実施形態において、前記第一の重鎖は、更に Y 9 6 F 修飾 (I M G T ; E U 番号付けによる Y 4 3 6 F) を含んだ C H 3 領域を具備する。更なる実施形態において、該方法は、プロテイン A を用いて前記抗体を単離することを含む。

【 0 0 9 2 】

50

本発明の別の態様は、二重特異的抗体であって、(a)第一の標的抗原を認識してこれに結合できる抗原結合性ドメインを備えた第一の重鎖と、(b)第二の標的抗原を認識してこれに結合できる抗原結合性ドメインを備えた第二の重鎖と、(c)前記第一または第二の標的抗原を認識してこれに結合できる抗原結合性ドメインを備えた共通の軽鎖とを具備し、前記(a)もしくは(b)、または(a)及び(b)の両方の重鎖が、配列番号53または配列番号54のアミノ酸配列を含むキメラヒンジ領域を備えた重鎖定常領域(CH)を具備する二重特異的抗体を提供する。

【0093】

一定の実施形態において、前記重鎖定常領域(CH)は、配列番号26、配列番号28、配列番号30、または配列番号32のアミノ酸配列を含んでいる。幾つかの実施形態において、前記キメラCHをコードするヌクレオチド配列は、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、または配列番号33を含んでいる。他の実施形態において、前記キメラCHヌクレオチド配列は、配列番号26、配列番号28、配列番号30、または配列番号32のアミノ酸配列をコードする。更に他の実施形態において、前記CH領域のヌクレオチド配列は、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、または配列番号33のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでいる。

10

【0094】

一定の態様において、前記二重特異的抗体は、配列番号35のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする核酸分を含んでいる。別の態様において、前記二重特異的抗体は配列番号34のヌクレオチド配列を含んだ、軽鎖をコードする核酸分子を含んでいる。

20

【0095】

一定の態様において、前記二重特異的抗体は、配列番号37のアミノ酸配列を含んだ重鎖をコードする核酸分子を含んでいる。他の態様において、前記二重特異的抗体は配列番号36のヌクレオチド配列を含んだ、重鎖をコードする核酸分子を含んでいる。

【0096】

一定の態様において、前記二重特異的抗体は、配列番号40のアミノ酸配列を含んだ重鎖をコードする核酸分子を含んでいる。他の態様において、前記二重特異的抗体は配列番号38または配列番号39のヌクレオチド配列を含んだ、重鎖をコードする核酸分子を含んでいる。

【0097】

一定の態様において、前記二重特異的抗体は、配列番号42のアミノ酸配列を含んだ重鎖をコードする核酸分子を含んでいる。他の態様において、前記二重特異的抗体は、配列番号41のヌクレオチド配列を含んだ重鎖をコードする核酸分子を含んでいる。

30

【0098】

一定の態様において、前記二重特異的抗体は、配列番号44のアミノ酸配列を含んだ重鎖をコードする核酸分子を含んでいる。他の態様において、前記二重特異的抗体は、配列番号43のヌクレオチド配列を含んだ重鎖をコードする核酸分子を含んでいる。

【0099】

別の態様において、本発明は、本明細書に開示する抗CD3/抗CD20二重特異的抗体結合性分子の治療的有効量を提供する。関連の態様において、本発明は、抗CD3/抗CD20二重特異的抗体結合性分子と、第二の治療剤との組合せである組成物を特徴とする。一つの実施形態において、前記第二の治療剤は、抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子と有利に組み合わせられる任意の薬剤である。抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子と有利に組み合わせられ得る典型的な薬剤は、本明細書の他の個所で詳細に述べる。

40

【0100】

更に別の態様において、本発明は、本発明の抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子を使用して、CD20を発現する腫瘍細胞をターゲティング/死滅させるための治療方法であって、本発明の抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子を含有する治療的有効量の医薬組成物を、それを必要としている被験者に投与することを含む方法を

50

提供する。幾つかの場合において、前記二重特異的抗原結合性分子（例えば抗体）は、CD20を発現するヒト細胞に結合し、またはヒトB細胞に結合する。

【0101】

更に別の態様において、本発明は二重特異的抗体を提供し、該抗体はヒトCD3を発現するヒト細胞及びカニクイザルCD3を発現するカニクイザル細胞に結合し；ヒトT細胞またはカニクイザルT細胞に結合し；CD3を発現するヒトT細胞に $1 \times 10^{-12} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の EC_{50} 値で結合し；CD3を発現するヒトT細胞に $1 \times 10^{-9} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ の EC_{50} 値で結合し；CD20を発現するヒトB細胞に $1 \times 10^{-12} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の EC_{50} 値で結合し；CD20を発現するヒトB細胞に $1 \times 10^{-9} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ の EC_{50} 値で結合し；または抗CD20媒介性の細胞傷害性に対して抵抗性または耐性であるヒトB細胞のT細胞媒介性の細胞傷害性を高める。

10

【0102】

本発明の種々の方法または使用において、少なくとも約0.01mg/kgの用量で前記二重特異的抗体を前記被験者に単回投与することは、前記二重特異的抗体の前記被験者への投与後の約2日までに、前記被験者におけるB細胞の数を検出可能なレベル未満にまで減少させる。幾つかの場合、少なくとも約0.01mg/kgの前記二重特異的抗体の単回用量を前記被験者に投与した後、少なくとも約7日までは、B細胞の数は検出可能なレベル未満のままである。

【0103】

本発明は、本発明の抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子の使用であって、CD20を発現する腫瘍細胞をターゲッティング/死滅させるための使用、及びCD20発現に関連した、または該発現により生じる疾患または障害の治療のための医薬の製造における使用を含むものである。幾つかの場合に、本発明の二重特異的抗体は、被験者において癌を治療または緩和するための医薬の製造において使用され、ここでの前記二重特異的抗体は、ヒトCD3に結合する第一の抗原結合性ドメインと、ヒトCD20に結合する第二の抗原結合性ドメインと、前記第一及び第二の抗原結合性ドメインの各々に繋がれたキメラFcドメインを具備し、また前記癌を治療または緩和することは、(a)前記被験者において腫瘍増殖を抑制すること、(b)前記被験者においてB細胞溶解を媒介すること、(c)前記被験者においてB細胞癌を治療すること、(d)前記被験者においてCD20発現が陽性の癌を治療すること、または(e)前記被験者においてCD20を発現するメラノーマ癌を治療することを包含する。

20

30

【0104】

本発明はまた、第一の抗原結合性ドメイン、第二の抗原結合性ドメイン、及びキメラ重鎖定常(CH)領域を備えた二重特異的抗体をも包含するものであり、ここで前記第一の抗原結合性ドメインはCD3に結合し、前記第二の抗原結合性ドメインはCD20に結合し、前記キメラCH領域は、野生型CH領域を備えた抗体に比較してより高い親和性、即ち、より強い親和性でヒトFcγRIIA及びヒトFcγRIIBに結合し、このような二重特異的抗体は医薬の製造における使用のためのものである。本発明は、CD3に結合する第一の抗原結合性ドメインと、CD20に結合する第二の抗原結合性ドメインと、及びヒトFcγRIIBに結合するよりも高い、即ち、強い親和性でヒトFcγRIIAに結合するキメラCH領域を備えた、医薬の製造において使用するための二重特異的抗体を提供する。

40

【0105】

他の実施形態は、以下の詳細な説明の検討から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図1】キメラヒンジ領域の構築に使用されるヒンジアミノ酸及び対応するアミノ酸番号付け規則を示す。

【図2】UniProtKB/Swiss-Prot・ACCN番号P01857においてIGHG1として記載された、CH1、ヒンジ、CH2及びCH3ドメインを含むヒト

50

I g G 1 重鎖定常領域のアミノ酸配列（配列番号 45）を表す。

【図 3】UniProtKB/Swiss-Prot・ACC N 番号 P 0 1 8 5 9 において I G H G 2 として記載された、C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 ドメインを含むヒト I g G 2 重鎖定常領域のアミノ酸配列（配列番号 46）を表す。

【図 4】UniProtKB/Swiss-Prot・ACC N 番号 P 0 1 8 6 1 において I G H G 4 として記載された、C H 1、ヒンジ、C H 2 及び C H 3 ドメインを含むヒト I g G 4 重鎖定常領域のアミノ酸配列（配列番号 47）を表す。

【図 5】図 5 A 及び図 5 B は、野生型またはキメラ型のヒンジ C_H 領域を有する抗体（「対照」抗体 4 = w t I g G 1・C_H を備えた二重特異性 A b、抗体 1、抗体 2、I g G 1 アイソタイプ対照 = w t I g G 1・C_H を備えた非特異的 A b）の存在下における、D a u d i 細胞（図 5 A）及び R a j i 細胞（図 5 B）に関する C D C 活性の欠如を示す用量応答曲線。

10

【図 6】図 6 A 及び図 6 B は、野生型またはキメラ型のヒンジ C_H 領域を有する抗体（「対照」抗体 4 = w t I g G 1・C_H を備えた二重特異性 A b；抗体 1；抗体 2；I g G 1 アイソタイプ対照 = w t I g G 1・C_H を備えた非特異的 A b）の存在下における、D a u d i 細胞（図 6 A）及び R a j i 細胞（図 6 B）に関する A D C C 活性の欠如を示す用量応答曲線。

【図 7 - 1】図 7 A ~ 図 7 F は、R a j i 腫瘍細胞及び P B M C（または P B M C 対照なし - 図 7 D）の混合物を皮下に移植した N S G マウスにおける、経時的な腫瘍体積（mm³）を示す。ここでは、本発明の C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体（A b 1）または担体または対照抗体の何れかが、腫瘍移植及び治療に続いて投与され、腫瘍移植の同じ日（第 0 日）に始まり、研究の全期間を通して測定された。図 7 A：担体治療で腫瘍増殖の阻害を示したマウスはいなかった；図 7 B：5 匹のマウスのうちの 1 匹（1 / 5）は、0 . 4 m g / k g の対照 A b 5（抗 F e I D 1 A b）治療で腫瘍増殖阻害を示した；図 7 C：5 / 5 のマウスが、0 . 4 m g / k g の抗体 1（A b 1）治療で腫瘍増殖阻害を示した；図 7 D：0 / 5 のマウスが腫瘍増殖阻害を示し、ここでは P B M C は移植されず、また 0 . 4 m g / k g の A b 1 治療が用いられた；図 7 E：5 / 5 のマウスが、0 . 0 4 m g / k g の A b 1 治療で腫瘍増殖阻害を示した；図 7 F：5 / 5 のマウスが、0 . 0 0 4 m g / k g の A b 1 治療で腫瘍増殖阻害を示した。

20

【図 7 - 2】図 7 - 1 の続き。

30

【図 8】図 8 A 及び図 8 B は、R a j i 腫瘍細胞及び P B M C の混合物を皮下に移植され、I g G 補充を伴うかまたは伴わない担体と比較して、A b 1（C D 3 × C D 2 0 - キメラ F c）で治療された N S G マウス（図 8 A）、または I g G 補充を伴うかまたは伴わない担体と比較して、A b 4（C D 3 × C D 2 0 - w t F c）で治療された N S G マウス（図 8 B）における経時的な腫瘍体積（mm³）を示す。両方の C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体は、このモデルにおいて、I g G 補充での有意な腫瘍増殖阻害を示す。図 8 A に見られるように、C D 3 × C D 2 0 - キメラ F c 二重特異的抗体（A b 1）は、この実験において、I g G 補充の有無にかかわらず試験された期間の全体に亘って完全な腫瘍増殖阻害を示す。

【図 9】C D 3 × C D 2 0 の二重特異的抗体で治療された N S G マウスにおいて、樹立された腫瘍（~ 2 0 0 - 4 0 0 mm³）の第 1 4 日までの退縮を示している。N S G マウスは、腫瘍を完全に樹立させるように、治療の 1 5 日前に R a j i 腫瘍細胞及び P B M C の混合物を皮下に移植された。その後、マウスは 0 . 4 m g / k g の抗体 1（C D 3 × C D 2 0 - キメラ F c 抗体）、または 0 . 4 m g / k g の対照 A b 5（抗 F e l D 1・A b）、または担体対照で週 1 回（第 7 日、第 1 4 日、第 2 1 日）治療された。

40

【図 10】C D 3 × C D 2 0 の二重特異的抗体で治療された N S G マウスにおいて、樹立された腫瘍（~ 5 0 0 - 9 0 0 mm³）の第 2 1 日までの退縮を示している。N S G マウスは、腫瘍を完全に樹立させるように、治療の 1 5 日前に R a j i 腫瘍細胞及び P B M C の混合物を皮下に移植された。その後、マウスは 0 . 4 m g / k g の抗体 1（C D 3 × C D 2 0 - キメラ F c 抗体）、または 0 . 4 m g / k g の対照 A b 5（抗 F e l D 1・A b

50

）で週 1 回（第 7 日、第 14 日、第 21 日）治療された。

【図 1 1】図 1 1 A 及び図 1 1 B は、7 日間の試験において、カニクイザルの末梢血中の CD20 + B 細胞レベルまたは CD3 + T 細胞レベルの変化を測定することによる、単一特異性抗体投与（リツキシマブ）と比較した抗体 1 及び抗体 4 CD3 × CD20 二重特異的抗体投与のインビボでの効力を示している。抗体またはプラセボを第 0 日に投与した。図 1 1 A：末梢血中の B 細胞レベルは、プラセボを除く全てのサンプルにおいて第 2 日までに有意に枯渇された。図 1 1 B：二重特異的抗体で治療された動物の末梢血中では、T 細胞の一過性の損失が第 2 日までに観察され、第 4 日までにベースラインレベルにまで回復した。T 細胞の損失（基準値未満）は、プラセボまたはリツキシマブ（リツキサン）群では観察されなかった。

10

【図 1 2】図 1 2 A 及び図 1 2 B は、長期間（3 月）の研究において、カニクイザルの末梢血中の CD20 + B 細胞レベルまたは CD3 + T 細胞レベルの変化を測定することによる、抗体 1 及び抗体 4 CD3 × CD20 二重特異的抗体投与のインビボでの効力を示している。プラセボ（担体）または二重特異的抗体は、1.0 mg / kg で第 0 日に投与した。図 1 2 A：末梢血中の B 細胞レベルは、プラセボを除く全てのサンプルにおいて第 2 日までに有意に枯渇され、また研究の長さに亘って枯渇したままであった。図 1 2 B：二重特異的抗体で治療された動物については、研究の全体を通して（> 80 日）測定したときに、T 細胞の一過性の損失が第 2 日までに観察され、次いで第 4 日までにベースラインレベルにまで回復し、その後は測定されたベースライン付近のままであった。T 細胞の損失（基準値未満）は、プラセボで治療された動物群では観察されなかった。

20

【図 1 3】図 1 3 A 及び図 1 3 B は、長期間（2 月）の研究において、カニクイザルの末梢血中の CD20 + B 細胞レベルまたは CD3 + T 細胞レベルの変化を測定することによる、抗体 1 及び抗体 4 CD3 × CD20 二重特異的抗体の低用量投与のインビボでの効力を示している。二重特異的抗体は、0.01 mg / kg または 0.001 mg / kg（1 µg / kg）で第 0 日に投与した。図 1 3 A：末梢血中の B 細胞レベルは、より高用量の CD3 × CD20 二重特異的抗体で治療された動物について観察されたのと同様に（図 1 1 A または図 1 2 A も参照のこと）、第 2 日までに有意に枯渇され、また研究の長さに亘って枯渇したままであった。図 1 3 B：きわめて低用量（1 µg / kg）の二重特異的抗体で治療された動物は、より高用量の CD3 × CD20 二重特異的抗体で治療された動物に見られるのと同じ T 細胞の一過性の損失及び回復を経験する（図 1 1 B または図 1 2 B も参照のこと）。

30

【図 1 4】CD3 × CD20 - キメラ Fc 抗体 1 で治療された動物の末梢血における、B 細胞喪失と抗体喪失との間の相関を示している。動物の循環系における抗体露出（白記号）が経時的に枯渇されるに伴って、B 細胞集団（黒記号）は回復を始める（例えば、動物番号 106881（黒丸）については第 81 日に観察される）。

【図 1 5】CD3 × CD20 - キメラ Fc 抗体 2 で治療された動物の末梢血における、B 細胞喪失と抗体喪失との間の相関を示している。動物の循環系における抗体露出（白記号）が経時的に枯渇されるに伴って、B 細胞集団（黒記号）は回復を始める（例えば、動物番号 106876 については第 66 日（黒三角）に、動物番号 106877 については第 68 日（黒四角）に観察される）。

40

【図 1 6】CD3 × CD20 - wt Fc（Ab4）二重特異的抗体で治療された動物の末梢血における、B 細胞喪失と抗体喪失との間の相関を示している。動物の循環系における抗体露出（白記号）が経時的に枯渇されるに伴って、B 細胞集団（黒記号）は回復を始める（例えば、動物番号 106870 については第 91 日（黒三角）に、動物番号 106872 については第 64 日（黒丸）に観察される）。

【図 1 7】図 1 7 A 及び図 1 7 B は、抗 CD20 単一特異性抗体と比較して、CD3 × CD20 二重特異的抗体の投与から生じるカニクイザルの脾臓における組織 B 細胞（図 1 7 A）または腸間膜リンパ節（図 1 7 B）の枯渇を描いており、二重特異性コホートに対しては遥かに低い用量（0.01 ~ 1.0 mg / kg 用量）が投与される。この枯渇は、プラセボ対照動物コホートにおいては、何れの組織においてもみられなかった。両方の CD

50

3 × C D 2 0 二重特異的抗体 (A b 1 及び A b 4) は、リンパ器官において用量依存的な B 細胞枯渇を生じ、また 0 . 1 m g / k g 以上の用量において、前記二重特異的抗体はリツキシマブよりも効率的に B 細胞を枯渇させる。

【図 1 8】図 1 8 A 及び図 1 8 B は、C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体は、インビトロでのバイオアッセイにいて、ヒト P B M C (図 1 8 A) またはカニクイザル P B M C (図 1 8 B) の増殖を誘導するのに対して、対照抗体 5 (- ▲ - ; C D 3 × C D 2 0 に対して特異性でない) は活性を示さなかったことを示している。

【図 1 9】図 1 9 A 及び図 1 9 B は、細胞傷害アッセイにおける、C D 3 × C D 2 0 に媒介された R a j i 標的殺滅を示している。抗体 1 は、ヒト (図 1 9 A) 及びカニクイザル (図 1 9 B) の T 細胞について、それぞれ 2 5 . 0 p M 及び 9 . 1 0 p M の代表的な E C₅₀ で標的細胞の殺滅を媒介した。抗体 4 は、ヒト (図 1 9 A) 及びカニクイザル (図 1 9 B) の T 細胞について、それぞれ 1 5 . 7 p M 及び 1 . 7 3 p M の代表的な E C₅₀ で標的細胞の殺滅を媒介した。対照 (- ▲ -) では活性は観察されなかった。

【図 2 0】図 2 0 A 及び図 2 0 B は、C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体が、未処置の T 細胞による細胞の死滅を媒介することを示している。図 2 0 A は、抗体 4 の最高試験濃度での代表的な F A C S 散乱プロットを示している。B 1 6 F 1 0 . 9 野生型細胞は C F D A - S E で標識され、B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0 細胞はバイオレット細胞追跡剤で標識される。エフェクター細胞は標識されない。図 2 0 A の 2 番目のパネルは、C D 2 0 を発現する細胞が抗 C D 3 × C D 2 0 での処理により除去されること (右下象限) を示している。図 2 0 B は、C D 2 0 × C D 3 抗体、すなわち抗体 4 (w t F c) 、抗体 1 (キメラ F c) または対照 A b 5 、及び P B M C の存在下での、4 8 時間後の B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0 細胞の生存比率を示している。生存パーセントは、生細胞集団において、C D 2 0 陰性 B 1 6 F 1 0 . 9 細胞に対する B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0 細胞のパーセンテージを比較することによって決定した。A b 4 及び A b 1 は、細胞の混合集団における C D 2 0 (図 2 0 B) を発現する標的細胞のみを死滅させるために、ヒト T 細胞に対して特異的に指向された。標的細胞の死滅は二重特異的抗体の存在においてのみ観察され、B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0 細胞は、抗体 4 (E C₅₀ : 1 2 . 8 5 p M) 及び抗体 1 (E C₅₀ 1 9 . 5 p M) によって用量依存的に枯渇された (図 2 0 B) 。 C D 2 0 発現細胞の 5 % 未満は、試験した最高用量 (1 0 μ g / m L) において生存した。

【図 2 1】B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0 細胞を標的とする 4 8 時間の細胞傷害性アッセイにおける、総 C D 2 + エフェクター細胞のうちの活性化された (C D 6 9 +) 細胞のパーセントを示しており、このような活性化は何れかの C D 2 0 × C D 3 抗体、即ち、抗体 4 (w t F c) または抗体 1 (キメラの F c) によって誘導されたものである。

【図 2 2】図 2 2 A 及び図 2 2 B は、C D 3 × C D 2 0 の二重特異的抗体が、その二重特異性結合性アームを介して、標的細胞 (C D 2 0 + 細胞) と T 細胞のクラスタリングを誘導したことを示している。エフェクター細胞を C F S E で染色し、C D 2 0 + 細胞はバイオレット細胞追跡剤で染色して、これらを別々の象限にゲーティングする。無関係な対照抗体 (対照抗体 5) と共にインキュベーションした後、細胞混合物中には何のクラスタリング (二重染色) も出現しない (図 2 2 A) 。 C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体 (A b 4) とのインキュベーション後に細胞クラスターが出現するが、これはそれらが C F S E 及びバイオレットの両方で染色されているからである (太字の四角によって強調されているので、図 2 2 B の散乱プロット左上の象限を参照されたい) 。

【図 2 3】R a j i 腫瘍細胞及び P B M C の混合物を皮下移植した N S G マウスにおける腫瘍体積 (m m³ で) 研究を示しており、0 . 4 m g / k g の本発明の C D 3 × C D 2 0 の二重特異的抗体 (A b 1) 、2 回 / 週 (i . p) 、0 . 4 m g / k g の無関係の抗体対照 A b 6 、2 回 / 週 (i . p) 、または担体が、リツキシマブ、0 . 4 m g / k g の抗 C D 2 0 抗体、5 回 / 週 (i . p) 、及び 0 . 5 m g / k g の C D 1 9 × C D 3 B i T E 、5 回 / 週 (i . v) と比較された (C D 1 9 × C D 3 B i T E については、N a g o r s e n D r a . P h a r m a c o l T h e r . 2 0 1 2 D e c ; 1 3 6 (3) : 3 3 4 - 4 2 , 2 0 1 2 を参照されたい) 。治療剤は、樹立された腫瘍 (~ 1 0 0 - 5 0 0 m m

10

20

30

40

50

³) を持つマウスに投与された。データは平均 (S E M) として表わされ、 A N O V A 解析に掛けられた。このインビボモデルにおいて、週 2 回 i . p 投与された A b 1 は、週 5 回 i . v 投与された C D 1 9 × C D 3 B i T E の効力に匹敵した。

【図 2 4】図 2 3 と同様に、 R a j i / P B M C 混合物を皮下移植した N S G マウスにおける腫瘍体積 (m m ³ で) 研究を示しているが、 A N O V A 解析は、 A b 1、対照 A b 6、リツキシマブ及び担体対照について提供された。樹立された R a j i 腫瘍を抑制することにおいて、週 2 回投与された A b 1 は、リツキシマブ療法 (8 m g / k g ; 5 回 / 週 i . p で投与された) よりも優れていた。

【図 2 5】図 2 5 A 及び図 2 5 B は、 C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体で治療されるヒト化マウスにおいて、 h C D 2 0 / B 1 6 F 1 0 . 9 腫瘍移植と同時に、またはその後に治療が開始されたときの、遅延された腫瘍増殖を示している。図 2 5 A : h C D 3 マウスは、 h C D 2 0 を遺伝子導入された B 1 6 F 1 0 . 9 メラノーマ細胞を皮下移植され、同時に 0 . 0 0 4 m g / k g または 0 . 4 m g / k g の抗体 1 (C D 3 × C D 2 0 - キメラ F c 抗体) または 4 m g / k g 対照 A b 5 (抗 F e I D 1 A b)、または担体対照 (週 2 回の i . p .) で治療された。図 2 5 B : h C D 3 マウスは、 h C D 2 0 / B 1 6 F 1 0 . 9 メラノーマ細胞を皮下移植され、樹立された腫瘍は第 1 0 日以降に、抗体 1 (C D 3 × C D 2 0 - キメラ F c 抗体) または対照で治療された。マウスは、 0 . 4 m g / k g または 4 m g / k g の A b 1、または 0 . 4 m g / k g の対照 A b 5 (抗 F e I D 1 A b)、または担体対照を用いて、週 2 回 i . p . で治療された。

【発明を実施するための形態】

【 0 1 0 7 】

本発明を説明する前に、方法及び条件は変化する可能性があるので、本発明は記載される特定の方法及び実験条件に限定されないことが理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明する目的のためだけのものであり、また本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるので、当該用語が限定を意図するものでないことが理解されるべきである。

【 0 1 0 8 】

他に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、一般的に、本発明が属する技術分野の当業者によって理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で使用されるとき、特定の引用された数値に関して使用される場合の「約」の用語は、その値が、列挙された値から 1 % 以下だけ変化してもよいことを意味し得る。例えば、本明細書で使用されるとき、「約 1 0 0」の表現は、99 及び 1 0 1、並びに 99 と 1 0 1 の間の全ての値 (例えば、99 . 1、99 . 2、99 . 3、99 . 4 等) を含む。

【 0 1 0 9 】

ここに記載するものに類似した、または均等の如何なる方法及び材料も本発明の実施または試験において使用し得るが、好ましい方法及び材料について以下に説明する。

【 0 1 1 0 】

< 定義 >

ここで用いられる「 C D 3」の表現は、多分子 T 細胞受容体 (T C R) の一部として T 細胞上で発現される抗体であって、2 ~ 4 の受容体鎖、即ち、 C D 3 イブシロン、 C D 3 デルタ、 C D 3 ゼータ、及び C D 3 ガンマの会合から形成されるホモ二量体またはヘテロ二量からなる抗原を意味する。本明細書においてタンパク質、ポリペプチド及びタンパク質断片への全ての言及は、非ヒト種に由来するものとして明示的に特定されない限り、それぞれのタンパク質、ポリペプチドまたはタンパク質断片のヒトバージョンを指称することが意図されている。従って、「 C D 3」の表現は、非ヒト種由来である (例えば「マウス C D 3」、「サル C D 3」等) として明示的に特定されない限り、ヒト C D 3 を意味する。

【 0 1 1 1 】

本明細書で使用されるとき、「 C D 3 に結合する抗体」または「抗 C D 3 抗体」は、単一の C D 3 サブユニット (例えば、イブシロン、デルタ、ガンマまたはゼータ) を特異的

に認識する抗体及びその抗原結合性断片、並びに二つのCD3サブユニットの二量体複合体（例えば、ガンマ/イプシロン、デルタ/イプシロン、ゼータ/ゼータCD3ダイマー）を特異的に認識する抗体及びその抗原結合性断片を含む。本発明の抗体及び抗原結合性断片は、可溶性CD3及び/または細胞表面に発現したCD3に結合してよい。可溶性CD3には、天然のCD3タンパク質、並びに組換えCD3タンパク質変異体、例えば膜貫通ドメインを欠失しているか、または細胞膜と結合していない単量体及び二量体のCD3構築物が含まれる。

【0112】

本明細書中で使用するとき、「細胞表面に発現されたCD3」の表現は、CD3タンパク質の少なくとも一部が細胞膜の細胞外側に露出して抗体の抗原結合部分がアクセス可能であるように、インビトロまたはインビボで細胞表面上に発現される1以上のCD3タンパク質を意味する。「細胞表面に発現されたCD3」には、細胞の膜における機能的なT細胞受容体の枠内に包含されるCD3タンパク質が含まれる。「細胞表面に発現されたCD3」の表現は、ホモ二量体またはヘテロ二量体（例えば、ガンマ/イプシロン、デルタ/イプシロン、ゼータ/ゼータCD3二量体）の一部として細胞表面に発現されたCD3タンパク質が含まれる。「細胞表面に発現されたCD3」の表現はまた、細胞の表面上に、他のCD3鎖タイプを伴わずに、それ自身で発現されるCD3鎖（例えば、CD3イプシロン、CD3デルタまたはCD3ガンマ）が含まれる。「細胞表面に発現されたCD3」は、正常にCD3タンパク質を発現する細胞の表面に発現されたCD3タンパク質を含むことができ、または該タンパク質からなることができる。或いは、「細胞表面に発現されたCD3」は、正常にはその表面にヒトCD3を発現しないが、該表面にCD3を発現するよう人工的に操作された細胞の表面に発現されたCD3タンパク質を含むことができ、または該タンパク質からなることができる。

10

20

【0113】

本明細書中で使用するとき、「抗CD3抗体」の表現には、単一特異性を備えた一価抗体、並びにCD3に結合する第一のアーム及び第二の（標的）抗原に結合する第二のアームを備えた二重特異的抗体が含まれ、ここでの抗CD3アームは、本明細書の表1または表2に記載のHCVR/LCVRまたはCDR配列の何れかを含んでいる。抗CD3二重特異的抗体の例は、本明細書の他の箇所に記載されている。「抗原結合性分子」の用語には、例えば二重特異的抗体を含む抗体、及び抗体の抗原結合性断片が含まれる。典型的な抗CD3抗体はまた、US2007/0280945A1、及び2013年9月19日出願されたPCT国際出願第PCT/US13/60511に記載されており、それらの各々を本明細書の一部として援用する。

30

【0114】

本明細書で使用する「CD20」の用語は、非ヒト種由来（例えば、「マウスCD20」、「サルCD20」等）として特定されない限り、ヒトCD20タンパク質を指称する。ヒトCD20タンパク質は、NCBI参照配列NP_690605.1のようなアミノ酸配列を有している。

【0115】

本明細書で使用するとき、「抗CD20抗体」の表現には、US7,879,984に記載された、リツキサン（リツキシマブ）のような単一の特異性を有する一価抗体が含まれる。典型的な抗CD20抗体はまた、US7,879,984、及び2013年9月19日出願されたPCT国際出願第PCT/US13/60511に記載されており、それらの各々を本明細書の一部として援用する。

40

【0116】

本明細書で使用する「抗体」の用語は、特定の抗原（例えばCD3）と特異的に結合または相互作用する少なくとも一つの相補性決定領域（CDR）を備えた、任意の抗原結合性分子または分子複合体を意味する。「抗体」の用語には、免疫グロブリンの4つのポリペプチド鎖、即ち、ジスルフィド結合によって相互接続された2つの重（H）鎖及び2つの軽（L）鎖を含む分子、ならびにその多量体（例えばIgM）が含まれる。各重鎖は

50

、重鎖可変領域（ここではH C V Rまたは V_H と略す）及び重鎖定常領域を含んでいる。重鎖定常領域は3つのドメイン、即ち、 $C_H 1$ 、 $C_H 2$ 及び $C_H 3$ を含んでいる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（L C V Rまたは V_L と略す）及び軽鎖定常領域を含んでいる。軽鎖定常領域は一つのドメイン（ $C_L 1$ ）を含んでいる。 V_H 領域及び V_L 領域は更に、フレームワーク領域（F R）と称するより保存された領域が介在された、相補性決定領域（C D R）と称する超可変領域へと細分化することができる。各 V_H 及び V_L 領域は3つのC D R及び4つのF Rで構成され、これらはアミノ末端からカルボキシ末端へと次の順序で配置される：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。本発明の別の実施形態において、抗C D 3抗体（またはその抗原結合部分）のF Rは、ヒト生殖細胞系配列と同一であってよく、或いは自然にまたは人工的に改変されてもよい。アミノ酸

10

【0117】

本明細書で使用する「抗体」の用語には、完全な抗体分子の抗原結合性断片も含まれる。ここで用いる抗体の「抗原結合性部分」、抗体の「抗原結合性断片」等の用語には、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、何らかの天然に生じる、酵素的に入手可能な、合成の、または遺伝子的に加工されたポリペプチドまたは糖タンパク質が含まれる。抗体の抗原結合性断片は、タンパク質分解性消化、または抗体可変ドメイン及び任意に定常ドメインをコードするDNAの操作及び発現を含む組換え遺伝子操作技術のような任意の適切な標準的技術を用いて、例えば完全な抗体分子から誘導することができる。このようなDNAは既知であり、及び/または商業的な供給源、DNAライブラリー（例えば、ファ

20

【0118】

抗原結合性断片の非限定的な例としては、(i) F a b断片；(i i) F (a b ') 2断片；(i i i) F d断片；(i v) F v断片；(V) 単鎖F v (s c F v) 分子；(v i) d A b断片；及び(v i i) 抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位（例えば、C D R 3ペプチドのような単離された相補性決定領域（C D R））または拘束されたF R 3 - C D R 3 - F R 4ペプチドが含まれる。他の操作された分子、例えばドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、C D R移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ（例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディ等）、小モジュール免疫医薬（S M I P）及びサメ可変I g N A Rドメインもまた、ここで用いる「抗原結合性断片」の表現の範囲内に包含される。

30

【0119】

抗体の抗原結合性断片は、典型的には、少なくとも1つの可変ドメインを含んでいる。該可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成であってよく、一般には、1以上のフレームワーク配列に対して隣接し、または該配列と共にインフレームである少なくとも一つのC D Rを含む。 V_L ドメインと関連付けられた V_H ドメインを有する抗原結合性断片において、 V_H ドメイン及び V_L ドメインは、相互に任意の適切な配置でおかれてよい。例えば、可変領域は二量体であってよく、 $V_H - V_H$ 、 $V_H - V_L$ または $V_L - V_L$ 二量体を含んでよい。或いは、抗体の抗原結合性断片は、単量体の V_H または V_L ドメインを含んでよい。

40

【0120】

一定の実施形態において、抗体の抗原結合性断片は、少なくとも一つの定常断片（F c）ドメインに共有結合され、或いはF cドメインに繋がれた少なくとも一つの可変ドメインを含んでよい。「係留された」の用語は、定常ドメインに係留された可変ドメインのように二つの成分を一緒にするための、共有結合またはリンカーポリペプチド配列を介した

50

直接の連結を意味する。従って、一定の実施例において、第一及び第二の抗原結合性ドメインを含む可変ドメイン、例えば、C D 3 及び C D 2 0 に結合して二重特異的抗体を形成するものは、各々が共有結合またはリンカーアミノ酸配列を介して、例えば、(N 末端から C 末端へ) 完全もしくは部分的な C_H 1、キメラヒンジ、C_H 2 及び C_H 3 ドメインに直接連結 (または係留) されてよい。本発明の抗体の抗原結合性断片内にみられ得る可変ドメイン及び定常ドメインの非限定的で典型的な構成は、次のものを含んでいる: (i) V_H - C_H 1 - ヒンジ - C_H 2 - C_H 3 ; (i i) V_H - ヒンジ - C_H 2 - C_H 3 ; (i i i) V_H - C_L ; (i v) V_L - C_H 1 - C_H 2 - C_H 3 ; (v) V_L - C_H 2 - C_H 3 ; 及び (v i) V_L - C_L。上記で列記した典型的な構成の何れかを含む可変ドメイン及び定常ドメインの任意の構成において、可変ドメイン及び定常ドメインは互いに直接連結されてよく、または本発明の完全もしくは部分的なキメラヒンジにより、または完全もしくは部分的な C_H 1 及びキメラヒンジにより連結 (係留) されよい。幾つかの場合には、ポリペプチドリinker (例えば、2 ~ 10 のアミノ酸から) が可変ドメイン及び F c ドメインを結合 (係留) してよく、または完全もしくは部分的なキメラヒンジ及び / または C_H 1 との追加の結合を含んでよい。ヒンジ領域は、少なくとも上側及び下側のヒンジ部アミノ酸から構成されてよく、これらは単一のポリペプチド分子内において、隣接する可変ドメイン及び / 又は定常ドメインの間の可撓性または半可撓性リンケージを生じる。更に、本発明の抗体の抗原結合性断片は、相互の及び / または 1 以上の単量体 V_H もしくは V_L ドメインとの非共有結合 (例えばジスルフィド結合により) において、上記で列記した可変及び定常ドメイン構成の何れかのホモ二量体またはヘテロ二量体 (または他の多量体) を含むことができる。

【 0 1 2 1 】

本明細書で開示される典型的な二重特異的抗体フォーマットを含んだ本発明の多重特異性抗体フォーマットは、典型的には、各可変ドメインが別々の抗原に特異的に結合できる少なくとも 2 つの異なる可変ドメインを含具備する。多重フォーマットは、当技術分野で利用可能な日常的な技術を用いて、本発明の抗体の抗原結合性断片との関連において使用するために適合させることができる。

【 0 1 2 2 】

本発明の抗体は、インビトロで測定したときに、減少した補体依存性細胞傷害 (C D C) または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) を有するように、または該細胞傷害性を有さないように修飾される。「補体依存性細胞傷害」(C D C) とは、補体の存在下での、抗原発現細胞の本発明の抗体による溶解を意味する。「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」(A D C C) は、F c 受容体 (F c R を) を発現する非特異的な細胞傷害性細胞 (例えば、ナチュラルキラー (N K) 細胞、好中球、及びマクロファージ) が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、それによって標的細胞の溶解を導く細胞媒介性反応を意味する。C D C 及び A D C C は、当該技術分野で周知であり且つ利用可能なアッセイを用いて測定することができる。(例えば、米国特許番号 5, 500, 362 及び 5, 821, 337、並びに C l y n e s ら (1998) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . (U S A) 95 : 652 - 656 参照)。抗体の重鎖定常領域 (C H) は、補体を固定して細胞依存性細胞傷害を媒介する抗体の能力において重要である。従って、抗体の C H は、該抗体が細胞傷害性を媒介するために望ましいかどうかに基づいて選択することができる。

【 0 1 2 3 】

本発明の一定の実施形態において、本発明の二重特異的抗体はヒト抗体である。本明細書で用いられる「ヒト抗体」の用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を含むことが意図されている。本発明のヒト抗体は、例えば C D R において、及び特に C D R 3 において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基 (例えば、インビトロでのランダムまたは部位特異的突然変異誘発により、またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異) を含んでいてよい。しかしながら、本明細書中で使用される「ヒト抗体」の用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来する C D R 配列がヒトフレームワーク配列上に移植された抗体

を含むことを意図するものではない。

【0124】

幾つかの実施形態において、本発明の抗体は組換えヒト抗体であってよい。本明細書で使用する、「組換えヒト抗体」の用語は、組換え手段により調製され、発現され、創生され、または単離される全てのヒト抗体、例えば宿主細胞（以下で更に説明する）中にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現された抗体、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリー（以下で更に説明する）から単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（例えばマウス）から単離された抗体（例えば、Taylorら（1992）Nuc l . A c i d s R e s . 2 0 : 6 2 8 7 - 6 2 9 5 参照）、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列への素ブライシングを含む他の任意の手段により調製、発現、作製または単離された抗体を含むことを意図している。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有している。しかしながら、一定の実施形態において、そのような組換えヒト抗体はインビトロ突然変異誘発（または、ヒトIg配列についてトランスジェニック動物を用いる場合には、インビボ体細胞突然変異誘発）を受け、従って、該組換え抗体のV_H及びV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列のV_H及びV_L領域配列に由来し、これに関連しているにも関わらず、インビボのヒト抗体生殖系列のレパートリー内に天然には存在しない可能性がある。

10

【0125】

ヒト抗体は、ヒンジの異質性に関連付けられる二つの形態で存在することができる。一つの形態において、免疫グロブリン分子は、二量体が鎖間の重鎖ジスルフィド結合により一緒に保持された約150～160kDaの安定した四鎖構築物を含んでいる。第二の形態において、前記二量体は鎖間ジスルフィド結合を介して連結されず、共有結合した軽鎖及び重鎖（半抗体）で構成される約75～80kDaの分子が形成される。これらの形態は、親和性精製の後でさえも分離が極めて困難であった。

20

【0126】

様々な無傷のIgGアイソタイプにおける前記第二の形態の出現頻度は、限定されるものではないが、抗体ヒンジ領域のアイソタイプに関連した構造上の相違によるものである。ヒトIgG4ヒンジのヒンジ領域における単一のアミノ酸置換は、有意に第2の形態の出現を、典型的にはヒトIgG1ヒンジを使用して観察されるレベルにまで低下させることができる（Angalら（1993）M o l e c u l a r I m m u n o l o g y 3 0 : 1 0 5 ）。本発明には、ヒンジ領域に、例えば製造の際に望ましい抗体形の収率を改善できる1以上の変異を有する抗体が包含される。

30

【0127】

本発明の抗体は、単離された抗体であることができる。本明細書で使用する「単離された抗体」とは、その自然環境の少なくとも一つの成分から同定され、分離及び/または回収された抗体を意味する。例えば、生物の少なくとも一つの成分から、或いはその中において前記抗体が天然に存在し、または天然に産生される組織もしくは細胞から分離または除去された抗体は、本発明の目的のための「単離された抗体」である。また、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイチュー抗体も含まれる。単離された抗体は、少なくとも一つの精製または単離工程を受けている抗体である。一定の実施形態によれば、単離された抗体は、他の細胞物質及び/または化学物質を実質的に含まないものであり得る。

40

【0128】

本明細書に開示される抗CD3または抗CD20可変領域は、該抗体が誘導された対応する生殖細胞系配列に比較して、重鎖及び軽鎖可変ドメインのフレームワーク及び/またはCDR領域に1以上のアミノ酸の置換、挿入及び/または欠失を含んでいてよい。このような変異は、本明細書に開示されたアミノ酸配列を、例えば公共の抗体配列データベースから入手可能な生殖細胞系配列と比較することによって、容易に確認することができる。本発明は、本明細書に開示されたアミノ酸配列の何れかに由来する抗体、その抗原結合性断片を含むものであり、ここでの1以上のフレームワーク及び/またはCDR領域内の

50

1 以上のアミノ酸は、前記抗原が由来する生殖細胞系配列の対応する残基に、または前記別のヒト生殖細胞系配列の対応する残基に、または前記対応する生殖系残基の保存敵アミノ酸置換に変異される（このような配列変化を、本明細書では一纏めに「生殖細胞系変異」と称する）。一定の実施形態において、V_H 及び / または V_L ドメイン内の全てのフレームワーク及び / または CDR 残基は、前記抗体が由来する元の生殖細胞系配列に見られる残基へと戻し変異させることができる。他の実施形態では、一定の残基だけ、例えば FR 1 の最初の 8 アミノ酸内または FR 4 の最後の 8 アミノ酸内に見られる変異された残基のみ、または CDR 1、CDR 2 または CDR 3 内に見られる変異された残基のみが元の生殖細胞系配列へと戻し変異される。他の実施形態においては、前記フレームワーク及び / または CDR 残基の一以上が、異なる生殖細胞系配列（即ち、前記抗体が由来する塩基生殖細胞系配列とは異なる生殖細胞系配列）の対応する残基へと変異される。更に、本発明の抗体は、塩基フレームワーク及び / または CDR 領域内の 2 以上の生殖細胞系変異の任意の組み合わせを含んでいてよく、例えば、ここでの一定の個々の残基は特定の生殖細胞系配列の対応する残基へと変異される一方、前記元の生殖細胞系配列とは異なる一定の他の残基は維持され、または異なる生殖細胞系配列の対応する残基へと変異される。一旦得られたら、1 以上の生殖系突然変異を含む抗体及び抗原結合断片は、改善された結合特異性、増大した結合親和性、改善されもしくは向上した拮抗剤もしくはアゴニストの生物学的性質（そのような場合であれば）、または低下した免疫原性等のような 1 以上の望ましい性質について容易に試験することができる。この一般的方法において得られた抗体及び抗原結合性断片は、本発明の範囲内に包含される。

10

20

【0129】

本発明にはまた、1 以上の保存的置換を有する本明細書中に開示された HCV R、LCV R、及び / または CDR のアミノ酸配列の任意の変異体を備えた抗 CD 3 もしくは抗 CD 20 の可変領域も含まれる。例えば、本発明は、本明細書表 1 に記載された HCV R、LCV R、及び / または CDR アミノ酸配列の何れかに対して、例えば 10 以下、8 以下、6 以下、4 以下等の保存性アミノ酸置換を備えた HCV R、LCV R、及び / または CDR アミノ酸配列を有する抗 CDR 抗体を含むものである。

【0130】

「エピトープ」の用語は、パラトープとして知られる抗体分子可変領域内の特定の抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は、複数のエピトープを有することができる。従って、異なる抗体は、抗原上の異なる領域に結合してよく、異なる生物学的効果を有することができる。エピトープは高次構造または線状の何れであってもよい。高次構造エピトープは、線状ポリペプチド鎖の異なる区分からの空間的に並置されたアミノ酸によって生じる。線状エピトープは、ポリペプチド鎖の隣接するアミノ酸残基によって生じるものである。一定の環境において、エピトープは抗原上の糖の部分、ホスホリル基またはスルホニル基を含み得る。

30

【0131】

「実質的同一性」または「実質的に同一」の用語は、核酸またはその断片に言及する場合、適切なヌクレオチドの挿入もしくは欠失と共に別の核酸（またはその相補鎖）と最適に整列された場合、以下で述べる FASTA、BLAST またはギャップのような周知の配列同一性のアルゴリズムにより測定したときに、少なくとも約 95 %、より好ましくは少なくとも約 96 %、97 %、98 % または 99 % のヌクレオチド配列の同一性が存在することを示す。基準核酸分子との実質的同一性を有する核酸分子は、一定の場合に、基準核酸分子によりコードされるポリペプチドと同一、または実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。

40

【0132】

ポリペプチドに適用される場合、「実質的同一性」または「実質的に類似」とは、二つのペプチド配列が、デフォルトギャップ重みを使用した GAP または BESTFIT のプログラムにより最適に整列された場合に、少なくとも 95 %、より好ましくは少なくとも 98 % もしくは 99 % の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない

50

残基位置は、保存的アミノ酸置換によって異なる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）をもった側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基で置換されたものである。一般に、保存的アミノ酸置換は、実質的にタンパク質の機能的性質を変化させない。2以上のアミノ酸配列が保存的置換により相互に異なる場合、パーセント配列同一性または類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するように上方調節され得る。この調節を行うための手段は当業者に周知である。例えば、Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307 - 331を参照されたい。類似した化学的特性をもった側鎖を有する一群のアミノ酸の例としては、(1)脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；(2)脂肪族 - ヒドロキシル側鎖：セリン及びトレオニン；(3)アミド含有側鎖：アスパラギン及びグルタミン；(4)芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン；(5)塩基性側鎖：リジン、アルギニン、及びヒスチジン；(6)酸性側鎖：アスパラギン酸及びグルタミン酸；(7)硫黄含有側鎖：システイン及びメチオニンが挙げられる。好ましい保存的アミノ酸置換群は：バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸 - アスパラギン酸、及びアスパラギン - グルタミンである。或いは、保存的置換は、Gonnetら (1992) *Science* 256: 1443 - 1445に開示されたPAM250対数尤度行列において正の値を有する任意の変化である。「中程度に保存的な」置換は、PAM250対数尤度行列において負でない値を有する任意の変化である。

10

20

【0133】

配列同一性とも呼ばれるポリペプチドについての配列類似性は、典型的には、配列解析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失及び他の改変に割り当てられる類似性の尺度を用いて、類似した配列をマッチングさせる。例えば、GCGソフトウェアはGap及びBestfitのようなプログラムを含んでおり、これは異なる生物種由来の相同性ポリペプチドのように密接に関連したポリペプチド間の配列相同性を決定するため、または野生型タンパク質とその変異タンパク質の間の配列相同性または配列同一性を決定するために、デフォルトのパラメータと共に使用することができる。例えば、GCGバージョン6.1を参照されたい。ポリペプチド配列はまた、デフォルトまたは推奨パラメータを用いたFASTA、GCGバージョン6.1のプログラムを使用して比較することができる。FASTA（例えば、FASTA2及びFASTA3）は、問合せ配列と検索配列の間の最良の重複領域の整列及びパーセント配列同一性を提供する（Pearson (2000) *supra*）。異なる生物由来の多数の配列を含むデータベースと本発明の配列とを比較する別の好ましいアルゴリズムは、デフォルトパラメータを使用したコンピュータープログラムBLAST、特にBLASTP又はTBLASTNである。例えば、Altschulら (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 410、及びAltschulら (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389 - 402を参照されたい。

30

【0134】

<二重特異的抗原結合性分子>

本発明の抗体は、二重特異性または多重特異性であることができる。多重特異性抗体は、一つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であってよく、または2以上の標的ポリペプチドについての特異的な抗原結合ドメインを含んでよい。例えば、Tuttleら, 1991, *J. Immunol.* 147: 60 - 69; Kuferら, 2004, *Trends Biotechnol.* 22: 238 - 244を参照されたい。本発明の抗CD3×CD20抗体は、別の機能性分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質に連結することができ、またはこれと同時に発現させることができる。例えば、抗体またはその断片は、別の抗体または抗体断片のような1以上の他の分子実体に機能的に連結されて（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、または非共有結合その他によって）、追加の結合特異性を備えた二重特異的抗体または多重特異性抗体を生じることができる。

40

【0135】

50

従って、本発明には、免疫グロブリンの一方の腕がヒトCD3に結合し、免疫グロブリンの他方のアームが標的抗原に特異的である二重特異的抗体が含まれる。CD3二重特異的抗体が結合する標的抗原は、細胞、組織、器官、微生物またはウイルスに発現し、またはその近傍に発現する任意の抗原であることができ、該抗原にターゲッティングされた免疫応答が望まれるものである。該CD3結合性アームは、本明細書の表1に記載されたHCV R/LCVRまたはCDRのアミノ酸配列何れかを含むことができる。

【0136】

抗体の一方のアームがCD3に結合し、他方のアームが標的抗原に結合する本発明の二重特異的抗体の関連において、前記標的抗原は腫瘍関連抗原であることができる。特異的腫瘍関連抗原の非限定的な例には、例えば、AFP、ALK、BAGEタンパク質、BIRC5（サバイピン）、BIRC7、βカテニン、brc-abl、BRCA1、BORIS、CA9、炭酸脱水酵素IX、カスパーゼ8、CALR、CCR5、CD19、CD20（MS4A1）、CD22、CD30、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、サイクリンB1、CYP1・B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/HER2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGEタンパク質（例えば、GAGE-1、-2）、GD2、GD3、GloboH、グリピカン3、GM3、gp100、HER2、HLA/B-raf、HLA/K-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、LMP2、MAGEタンパク質（例えば、MAGE-1、-2、-3、-4、-6、及び12）、MART-1、メソテリン、ML-IAP、Mud1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Mud16（CA-125）、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53の、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA（FOLH1）、RAGEタンパク質、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、STEAP-1、Seap-2、TAG-72、TGF-β、TMPRSS2、トンプソン-ヌーベル抗原（Tn）、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼ、及びウロプラキン-3が含まれる。

【0137】

抗体の一方のアームがCD3に結合し、他方のアームが標的抗原に結合する本発明の二重特異的抗体の関連において、前記標的抗原は感染症関連抗原であることができる。感染症関連抗原の非限定的な例としては、例えば、ウイルス粒子の表面上に発現し、または該ウイルスに感染した細胞上に優先的に発現される抗原が含まれ、前記ウイルスはHIV、肝炎（A、BまたはC）、ヘルペスウイルス（例えば、HSV-1、HSV-2、CMV、HAV-6、VZV、エプスタインバーウイルス）、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、HTLV、デング熱ウイルス、パピローマウイルス、軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、JCウイルス、及びアルボウイルス性脳炎ウイルスからなる群から選択される。或いは、前記標的抗原は、細菌の表面に発現される抗原、または細菌に感染される細胞に優先的に発現される抗原であることができ、ここでの前記細菌はクラミジア、リケッチア、マイコバクテリア、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎連鎖球菌、髄膜炎菌、淋菌、クレブシエラ、プロテウス、セラチア、シュドモナス、レジオネラ、ジフテリア、サルモネラ菌、菌、コレラ、破傷風、ボツリヌス中毒、炭疽菌、ペスト、レプトスピラ、及びライム病細菌からなる群から選択される。一定の実施形態において、前記標的抗原は真菌の表面上に発現される抗原、または真菌に感染した細胞上に優先的に発現される抗原であり、ここでの前記真菌はカンジダ（アルビカンズ、クルセイ、グラブラタ、トロピカ等）、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、アスペルギルス（フミガタス、ニジェール等）、ケカビ目（ムコール、アブシディア、リゾプス等）、スポロスリックス・シェンキー、プラストミセスデルマ、パラコキシジオイデス・ブラジリエンシス、コキシジオイデス虫、及びヒストプラスマ・カプスラーツムからなる群から選択される。特定の実施形態では、前記標的抗原は寄生生物の

10

20

30

40

50

表面上に発現する抗原、または寄生虫に感染した細胞上に優先的に発現する抗原であり、前記寄生虫は赤痢アメーバ、バランチジウム・コリ、ネグレリアフォーレリ、アカントアメーバ属、ジアルジア・ランビア、クリプトスポリジウム属、カリニ肺炎菌、三日熱マラリア原虫、ネズミバベシア、トリパノソーマ、クルーズトリパノソーマ、ドノバンリーシユマニア、トキソプラズマ、ニッポストロンギルス属・ブラジリエ、テニア・クラッシセプス (crassiceps)、及びマレー系状虫からなる群から選択される。特定の病原体関連抗原の非限定的な例としては、例えば、HIV・gp120、HIV・CD4、B型肝炎糖タンパク質L、B型肝炎糖タンパク質M、B型肝炎糖タンパク質S、C型肝炎E1、C型肝炎E2、肝細胞特異的タンパク質、単純ヘルペスウイルスgB、サイトメガロウイルスgB、及びHTLVエンベロープタンパク質が含まれる。

10

【0138】

特定の典型的な実施形態によれば、本発明には、具体的には、CD3及びCD20に特異的に結合する二重特異的抗原結合性分子が含まれる。このような分子は、本明細書では「抗CD3/抗CD20」または「抗CD3/CD20」または「抗CD3×CD20」または「CD3×CD20」二重特異的分子、または他の類似の用語で指称され得る。

【0139】

本明細書中で使用するとき、「抗原結合性分子」の表現は、単独で、または1以上の追加のCDR及び/またはフレームワーク領域 (FR) との組み合わせにおいて、特定の抗原に特異的に結合する相補性決定領域 (CDR) を含んだ、または該領域からなるタンパク質、ポリペプチドまたは分子複合体を意味する。一定の実施形態において、抗原結合性分子とは、これら用語が本明細書の別の個所で定義されるように、抗体または抗体の断片である。

20

【0140】

本明細書で用いるとき、「二重特異的抗原結合性分子」の表現は、少なくとも第一の抗原結合性ドメイン及び第二の抗原結合性ドメインを含むタンパク質、ポリペプチドまたは分子複合体を意味する。該二重特異的抗原結合性分子内における各抗原結合性ドメインは、単独で、または1以上の追加のCDR及び/またはFRとの組み合わせにおいて、特定の抗原に特異的に結合する少なくとも一つのCDRを備えている。本発明の文脈において、第一の抗原結合性ドメインは第一の抗原 (例えば、CD3) に特異的に結合し、第二の抗原結合ドメインは第二の異なる抗原 (例えば、CD20) に特異的に結合する。

30

【0141】

本発明の一定の典型的な実施形態において、前記二重特異的抗原結合性分子は、二重特異的抗体である。二重特異的抗体の各抗原結合ドメインは、重鎖可変領域 (HCVR) 及び軽鎖可変領域 (LCVR) を含む。第一及び第二の抗原結合性ドメインを含む二重特異的抗原結合性分子 (例えば、二重特異的抗体) の関連において、前記第一の抗原結合ドメインのCDRは接頭辞「A1」で指定されてよく、また第二の抗原結合ドメインのCDRは接頭辞「A2」で指定されてよい。従って、前記第一の抗原結合ドメインのCDRは、本明細書ではA1-HCDR1、A1-HCDR2、及びA1-HCDR3と称することができ；また第二の抗原結合ドメインのCDRは、本明細書ではA2-HCDR1、A2-HCDR2、及びA2-HCDR3と指称することができる。

40

【0142】

第一の抗原結合性ドメイン及び第二の抗原結合性ドメインは、直接的または間接的に相互に結合されて本発明の二重特異的抗原結合性分子 (即ち、二重特異性 scFv) を形成し、更にFcドメインに結合されてよい。或いは、第一の抗原結合性ドメイン及び第二の抗原結合性ドメインは、各々が別個のFcドメインに結合されてもよい。本発明の二重特異的抗原結合性分子は、典型的には、各々が別々の抗体重鎖の一部である2つのFcドメインを含むであろう。この第一及び第二のFcドメインは、ヘテロ二量体 (すなわち二重特異性) 分子の精製を促進または容易にするためにCH3ドメインに変異を有する以外は、同じ配列のものであってよい。

【0143】

50

本発明には、第一の C_H3 ドメイン及び第二の I g C_H3 ドメインを備えた二重特異性の抗原結合性分が含まれ、ここでの第一及び第二の I g C_H3 ドメインは、少なくとも一つのアミノ酸が相互に異なり、また少なくとも一つのアミノ酸の相違は、このアミノ酸の相違を欠いた二重特異的抗体と比較して、プロテイン A に対する該二重特異的抗体の結合を低下させる。一実施形態において、前記第一の I g C_H3 ドメインはプロテイン A に結合し、前記第二の I g C_H3 ドメインは、H 4 3 5 R 修飾 (E U 番号付けによる ; I M G H エキソン番号付けによる H 9 5 R) のようなプロテイン A 結合を低減または無効にする。第二の C_H3 は更に、Y 4 3 6 F 修飾 (E U 番号付けによる ; I M G H による Y 9 6 F) を含んでいる。第二の C_H3 内において発見できる更なる修飾には次のものが含まれる : 即ち、I g G 1 C_H3 ドメインの場合は、E U による D 3 5 6 E、L 3 5 8 M、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、及び V 4 2 2 I (I M G T による D 1 6 E、L 1 8 M、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、及び V 8 2 I) ; また I g G 4 C_H3 ドメインの場合には、E U による Q 3 5 5 R、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、V 3 9 7 M、R 4 0 9 K、E 4 1 9 Q、及び V 4 2 2 I (I M G T による Q 1 5 R、N 4 4 S、K 5 2 N、V 5 7 M、R 6 9 K、E 7 9 Q、及び V 8 2 I) である。

【0144】

他の二重特異的抗体のフォーマットまたは技術が、本発明の二重特異的抗原結合性分子を作製するために使用されてよい。例えば、第一の抗原結合特異性を有する抗体またはその断片は、1 以上の他の分子実体、例えば第二の抗原結合特異性を有する別の抗体またはその断片に機能的に連結されて (例えば化学的カップリング、遺伝子融合、また非共有会合その他によって)、二重特異性の抗原結合性分子を生じることができる。本発明の関連において使用することができる特定の典型的な二重特異性フォーマットには、限定されるものではないが、例えば、s c F v ベースのまたはダイアボディ二重特異性フォーマット、I g G - s c F v 融合、二重可変ドメイン (D V D) - I g、クアドローマ、ノブ・インツ・ホール (K n o b s - i n t o - h o l e s)、共通の軽鎖 (例えば、ノブ・インツ・ホール等と共通の軽鎖)、交差 M a b、交差 F a b、(S E E D) ボディー、ロイシンジッパー、デュオボディー (D u o b o d y)、I g G 1 / I g G 2、二重作用性 F a b (D A F) - I g G、及び M a b² 二重特異性フォーマットが含まれる (上記フォーマットの論評については、例えば、K l e i n ら 2 0 1 2, m A b s 4 : 6, 1 - 1 1、及びそこに引用された参考文献を参照されたい)。

【0145】

本発明の二重特異的抗原結合性分子との関連において、前記 F c ドメインは、F c ドメインの特定のキメラバージョンに比較して望ましい機能性を変化させることなく、1 以上のアミノ酸変化 (例えば挿入、欠失または置換) を含み得る。例えば、本発明には、F c と F c R n の間の修飾された (例えば、増強または減弱された) 結合的相互作用をもった改変 F c 領域を生じるような、F c ドメイン内の 1 以上の修飾を含んだ二重特異性の抗原結合性分子が含まれる。一実施形態において、前記二重特異的抗原結合性分子は、C_H2、または C_H3 領域内の修飾を含んでおり、ここでの前記修飾は、酸性環境において (例えば、p H が約 5 . 5 ~ 約 6 . 0 の範囲にあるエンドソームにおいて) F c ドメインの F c R n に対する親和性を増大させる。そのような F c 修飾の非限定的な例には、例えば 2 5 0 位 (例えば、E または Q) ; 2 5 0 及び 4 2 8 位 (例えば、L または F) ; 2 5 2 位 (例えば、L / Y / F / W または T) 、2 5 4 位 (例えば、S または T) 、及び 2 5 6 位 (例えば、S / R / Q / E / D または T) における修飾 ; または 4 2 8 位及び / または 4 3 3 位 (例えば、L / R / S / P / Q または K) における修飾及び / または 4 3 4 位 (例えば、H / F または Y) ; または 2 5 0 位及び / または 4 2 8 位における修飾 ; または 3 0 7 位または 3 0 8 位 (例えば、3 0 8 F、V 3 0 8 F) 、及び 4 3 4 位における修飾が含まれる。1 つの実施形態において、前記修飾には、4 2 8 L (例えば、M 4 2 8 L) 及び 4 3 4 S (例えば、N 4 3 4 S) 修飾 ; 4 2 8 L、2 5 9 I (例えば、V 2 5 9 I) 、及び 3 0 8 F (例えば、V 3 0 8 F) 修飾 ; 4 3 3 K (例えば、H 4 3 3 K) 及び 4 3 4 (例えば、4 3 4 Y) 修飾 ; 2 5 2、2 5 4、及び 2 5 6 (例えば、2 5 2 Y、2 5 4 T

、及び 2 5 6 E) 修飾 ; 2 5 0 Q 及び 4 2 8 L 修飾 (例えば、T 2 5 0 Q 及び M 4 2 8 L) ; 及び 3 0 7 及び / または 3 0 8 修飾 (例えば、3 0 8 F または 3 0 8 P) が含まれる。

【 0 1 4 6 】

< 配列変異体 >

本発明の抗体及び二重特異的抗原結合性分子は、対応する個々の抗原結合性ドメインが由来する生殖細胞系配列と比較したときに、重鎖及び軽鎖可変ドメインのフレームワーク及び / または C D R 領域において 1 以上のアミノ酸の置換、挿入及び / または欠失を含んでいてよい。このような変異は、本明細書に開示されたアミノ酸配列を、例えば、公共の抗体配列データベースから入手可能な生殖細胞系配列に比較することによって容易に確認することができる。本発明の抗原結合性分子は、本明細書に開示した典型的なアミノ酸配列の何れかに由来する抗原結合性ドメインを含んでおり、ここでの 1 以上のフレームワーク及び / または C D R 領域内の 1 以上のアミノ酸配列は、前記抗体が由来する生殖細胞系配列の対応する残基へと変異され、または別のヒト生殖細胞系配列の対応する残基へと変異され、または対応する生殖系残基の保存的アミノ酸置換へと変異される (このような配列変化は本明細書では一纏めに「生殖細胞系変異」と称する) 。当業者は、本明細書に開示された重鎖及び軽鎖可変領域配列で開始して、1 以上の個々の生殖細胞系変異またはそれらの組み合わせを含む、多数の抗体及び抗原結合性断片を製造することができる。一定の実施形態において、V_H 及び / または V_L ドメイン内のフレームワーク及び / または C D R 残基の全部が、当該抗原結合性ドメインが最初に誘導された起源としての生殖細胞系配列に見られる残基へと戻し変異される。他の実施形態においては、特定の残基のみが元の生殖細胞系配列へと戻し変異され、例えば、F R 1 の最初の 8 アミノ酸内または F R 4 の最後の 8 アミノ酸内に見られた突然変異された残基のみ、或いは、C D R 1、C D R 2 または C D R 3 内で見られた変異した残基のみが戻し変異される。他の実施形態では、1 以上のフレームワーク及び / または C D R 残基 (複数可) が、異なる生殖細胞系配列 (即ち、前記抗原結合性ドメインが最初に誘導された生殖細胞系配列とは異なる生殖細胞系配列) の対応する残基へと変異される。更に、前記抗原結合性ドメインは、フレームワーク及び / または C D R 領域内の 2 以上の生殖細胞系変異の任意の組み合わせを含んでいてよく、例えば、ここでは一定の個々の残基が特定の生殖細胞系配列の対応する残基に変異される一方、前記元の生殖細胞系配列とは異なる一定の他の残基は維持されるか、または異なる生殖細胞系配列の対応する残基へと変異される。一旦得られたら、1 以上の生殖細胞系変異を含む抗原結合性ドメインは、1 以上の所望の特性、例えば改善された結合特異性、増大した結合親和性、改善もしくは向上された拮抗剤もしくはアゴニストとしての生物学的特性 (場合に応じて) 、低下した免疫原性等に関して容易に試験することができる。この一般的方法で得られた 1 以上の抗原結合性ドメインを含む二重特異的抗原結合性分子は、本発明の範囲内に包含されるものである。

【 0 1 4 7 】

本発明にはまた、一方または両方の抗原結合性ドメインが、1 以上の保存的置換を有する本明細書に開示された H C V R、L C V R、及び / または C D R アミノ酸配列の任意の変異体を含んだ抗原結合性分子が含まれる。例えば、本発明は、ここに開示された H C V R、L C V R、及び / または C D R の何れかに対して、例えば 1 0 以下、8 以下、6 以下、4 以下等の保存的アミノ酸置換を含んだ H C V R、L C V R、及び / または C D R アミノ酸配列を有する抗原結合性ドメインを具備する抗原結合性分子を含むものである。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の化学的特性 (例えば、電荷または疎水性) を備えた側鎖 (R 基) を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。一般的に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させない。類似の化学的特性を有する側鎖を有するアミノ酸群の例としては、(1) 脂肪族側鎖 : グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン ; (2) 脂肪族 - ヒドロキシル側鎖 : セリン及びトレオニン ; (3) アミド含有側鎖 : アスパラギン及びグルタミン ; (4) 芳香族側鎖 : フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン ; (5) 塩基性側鎖 : リジン、

アルギニン、及びヒスチジン；（６）酸性側鎖：アスパラギン酸及びグルタミン酸、また（７）硫黄含有側鎖のシステイン及びメチオニンが含まれる。好ましい保存的アミノ酸置換群は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、及びアスパラギン - グルタミンである。或いは、保存的置換は、G o n n e t t ら（１９９２）S c i e n c e 256：1443 - 1445に開示されているP A M 250対数尤度行列において正の値を有する任意の変化である。「中程度に保存的な」置換は、P A M 250対数尤度行列において負でない値を有する任意の変化である。

【0148】

配列同一性とも呼ばれるポリペプチドの配列類似性は、配列分析ソフトウェアを使用して測定することができる。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失及び他の修飾に割り当てられる類似性の尺度を用いて、類似の配列をマッチングさせる。例えば、G C G ソフトウェアはG a p 及びB e s t f i t のようなプログラムを含んでおり、これは生物の異なる種から相同性ポリペプチドのような密接に関連したポリペプチドの間、または野生型タンパク質とその変異タンパク質の間における配列相同性または配列同一性を決定するために、デフォルトパラメータと共に使用することができる。例えば、G C G バージョン6.1を参照されたい。ポリペプチド配列は、デフォルトまたは推奨のパラメータ、G C G バージョン6.1のプログラムを用いたF A S T A を使用して比較することができる。F A S T A（例えば、F A S T A 2 及びF A S T A 3）は、問合せ配列と検索配列の間の最良の重複領域のアラインメント及びパーセント配列同一性を提供する（P e a r s o n（2000）s u p r a）。本発明の配列を異なる生物由来の多数の配列を含むデータベースと比較する別の好ましいアルゴリズムは、デフォルトパラメータを使用するコンピュータープログラムB L A S T、特にB L A S T P またはT B L A S T N である。例えば、A l t s c h u l ら（1990）J . M o l . B i o l . 215：403 - 410、及びA l t s c h u l ら（1997）N u c l e i c A c i d s R e s . 25：3389 - 402を参照されたい。

【0149】

< p H 依存的結合 >

本発明には、p H 依存的結合特性を備えた、抗C D 3 / 抗C D 20二重特異的抗体が含まれる。例えば、本発明の抗C D 3 抗体は、中性p H と比較して、酸性p H ではC D 3 に対して低下した結合を示す可能性がある。或いは、本発明の抗C D 3 抗体は、中性p H と比較して、酸性p H ではC D 3 に対する増強した結合を示す可能性がある。「酸性p H」の表現には、約6.2未満のp H 値、例えば約6.0、5.95、5.9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0、またはそれ以下のp H 値が含まれる。本明細書で使用する時、「中性p H」の表現は、約7.0～約7.4のp H を意味する。「中性p H」の表現には、約7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35、及び7.4のp H 値が含まれる。

【0150】

一定の場合において、「中性p H と比較して、... 酸性p H において低下した結合」とは、中性p H における抗原への抗体結合の K_D 値に対する、酸性p H における抗原への抗体結合の K_D 値の比（またはその逆）で表される。例えば、抗体またはその抗原結合性断片は、該抗体またはその抗原結合断片が、約3.0以上の酸性/中性 K_D 比を示す場合に、本発明の目的では「中性p H と比較して、酸性p H におけるC D 3 への低下した結合」を示すと看做することができる。一定の典型的な実施形態において、本発明の抗体または抗原結合性断片についての酸性/中性 K_D 比は、約3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、または100.0以上であることができる。

【0151】

pH依存性の結合特性をもった抗体は、中性pHと比較して、酸性pHにおける特定の抗原への結合の低下（または増強）について、抗体の集団をスクリーニングすることにより取得することができる。加えて、アミノ酸レベルでの抗原結合性ドメインの修飾によって、pH依存性の特性を有する抗体を生じる可能性がある。例えば、抗原結合性ドメイン（例えばCDR内）の1以上のアミノ酸をヒスチジン残基で置換することにより、中性pHと比較して酸性pHにおいて抗原結合性が低下した抗体を得ることができる。

【0152】

<Fc受容体結合>

本発明の抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子及び抗体は、別のIgGアイソタイプに由来するIg重鎖のヒンジ-CH₂-CH₃定常ドメインのようなキメラFcドメインを具備するように、またFc受容体結合及び活性化に関するユニークな特性を有するように提供される。本発明の一定のFcドメインは、キメラヒンジを具備するように操作される。

10

【0153】

本明細書で使用される「キメラ」の用語は、起源の異なる部分で構成されることを意味する。「キメラタンパク質」の語句は、自然においては通常は結合しない第二のアミノ酸タンパク質に連結された第一のアミノ酸タンパク質を含む。これらのアミノ酸配列は、通常は別々のタンパク質として、または同じタンパク質上に異なる配置で存在することができ、新たな配置で融合ポリペプチドの中に一緒にされる。キメラタンパク質は、当該技術において知られた種々の方法によって、例えば化学合成により、またはキメラタンパク質のアミノ酸をコードするポリヌクレオチドを所望の配置で作製することによって創生できる。典型的なキメラタンパク質は、IgGの重鎖ドメインを連結するキメラヒンジ配列と、本発明のヒト抗体及び抗原結合性タンパク質を作製するように加工された融合タンパク質を含む。

20

【0154】

本明細書に開示されたキメラタンパク質は、例えば、野生型IgG・Fc領域またはドメインと比較して、接合部における免疫原性エピトープの生成を最小限に抑えるように設計された。従って、本発明の操作されたタンパク質は、低下した免疫原性を有し、Fc受容体への低下した結合性を示し、並びに無くなるまで低下したエフェクター機能を示す。

30

【0155】

「ヒンジ」の用語は、本明細書で使用するときは、免疫グロブリンのC_H1のC末端をC_H2のN末端に結合する連続するアミノ酸残基の領域を含むことが意図されている。C_H2エキソンによりコードされるC_H2のN末端の幾つかのアミノ酸はまた、「下側ヒンジ」の一部とみなされる。如何なる理論にも拘束されるものではないが、IgG1、IgG2及びIgG4のヒンジ領域のアミノ酸は、異なるヒンジエキソンによりコードされる12~15の連続したアミノ酸、及びC_H2ドメインの幾つかのN末端アミノ酸（C_H2エキソンによってコードされる）を含むものとして特徴付けられている（Brekke, O. Hら. Immunology Today 16(2): 85-90 (1995)）。他方、IgG3は4つのセグメント、即ちIgG1のヒンジ領域に類似した一つの上部セグメント、及びIgG3に固有の同一のアミノ酸リピートである三つのセグメントからなるヒンジ領域を含んでいる。

40

【0156】

本明細書で使用される「キメラヒンジ」の用語は、一つのIg分子のヒンジ領域に由来する第一のアミノ酸配列と、異なる分類またはサブ分類のIg分子のヒンジ領域に由来する第二のアミノ酸配列を含むキメラタンパク質を含むことが意図されている。本発明の例示的なキメラヒンジは、ヒトIgG1ヒンジ領域またはヒトのIgG4ヒンジ領域に由来する第一のアミノ酸配列または「上側ヒンジ」配列、及びヒトIgG2のヒンジ領域に由来する第二のアミノ酸配列または「下側ヒンジ」配列を含んでいる。一定の実施形態では、第一のまたは「上側ヒンジ」配列は、EU番号付けによる216~227位のアミノ酸

50

残基を含む。幾つかの実施形態では、第二のまたは「下側ヒンジ」配列は、EU番号付けによる228～236位のアミノ酸残基を含む。

【0157】

本開示の目的にとって、「上側ヒンジ」領域は、EU番号付けによる216～227位のアミノ酸残基（カバット番号付けによる226～240位のアミノ酸残基）を含むことが意図されている（図1参照）。「下側ヒンジ」領域は、EU番号付けによる228～236位のアミノ酸残基（カバット番号付けによる241～249位のアミノ酸残基位）を含むことが意図されている（図1参照）

【0158】

本開示では、本発明の実施者の便宜のために、ヒトIgG1、IgG2及びIgG4のためのヒンジ領域のアミノ酸が、カバットのEU番号付けシステム（Kabat, E. Aら, 免疫学的に興味のあるタンパク質の配列、第5版、米国保健社会福祉省、NIH公開番号91-3242（1991））によって、本明細書において同定されている。この番号付けシステムは、2001年5月17日に作製され、2013年1月10日に最後に更新された、IMGT（登録商標）Scientific Chart, I M G T（登録商標）, the international ImmunoGenetics information system（登録商標）, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnumber.htmlに従って更新された、「EU番号付け」または「EUインデックス」としても知られている。

【0159】

ヒトIgG1、IgG2及びIgG4ヒンジアミノ酸のためのEU番号付けと、IMGT固有ドメイン番号付け、IMGTエキソン番号付け、及びカバット番号付けの規則（Kabat, E. Aら, 1991, supraも参照のこと）との間の対応関係は、以下の表A～表Fに記載されている。

【0160】

【表1】

表A：IgG1ヒンジの番号付け

IgG1 (IGHG1) アミノ酸 [Swiss Prot P01857]	ヒンジのための IMGT固有番号 付け*	IMGTエキソン 番号付け*	EU 番号付け	Kabat 番号付け
(E)	1	1	216	226
P	2	2	217	227
K	3	3	218	228
S	4	4	219	232 ^a [229] ^b
C	5	5	220	233 ^a [230] ^b
D	6	6	221	234 ^a [232] ^b
K	7	7	222	235
T	8	8	223	236
H	9	9	224	237
T	10	10	225	238
C	11	11	226	239
P	12	12	227	240
P	13	13	228	241
C	14	14	229	242
P	15	15	230	243

【0161】

【表 2】

表B：I g G 1・Cコードメインのヒンジ番号付け

I g G 1 (I G H G 1) アミノ酸 [Swiss Prot P01857]	Cコードメインのた めの I M G T 固有 番号付け*	I M G T エキソ ン番号付け*	E U 番号付け	K a b a t 番号付け
(A)	1.6	1	231	244
P	1.5	2	232	245
E	1.4	3	233	246
L	1.3	4	234	247
L	1.2	5	235	248
G	1.1	6	236	249

10

【 0 1 6 2 】

【表 3】

表C：I g G 2 ヒンジの番号付け

I g G 2 (I G H G 2) アミノ酸 [Swiss Prot P01859]	ヒンジのための I M G T 固有番号 付け*	I M G T エキソ ン番号付け*	E U 番号付け	K a b a t 番号付け
(E)	1	1	216	226
R	2	2	217	227
K	3	3	218	228
C	4	4	219 ^a (221) ^b	232
C	5	5	220 ^a (-) ^b	233
V	6	6	222	235
E	7	7	224	237
C	8	8	226	239
P	9	9	227	240
P	10	10	228	241
C	11	11	229	242
P	12	12	230	243

20

30

【 0 1 6 3 】

【表 4】

表D：I g G 2・Cコードメインのヒンジ番号付け

I g G 2 (I G H G 2) アミノ酸 [Swiss Prot P01859]	E U 番号付け	K a b a t 番号付け
(A)	231	244
P	232	245
P	233	246
V	234	247
A	235	248
--	236	249

40

【 0 1 6 4 】

【表 5】

表 E : I g G 4 ヒンジの番号付け

I g G 4 (I G H G 4) アミノ酸 [Swiss Prot P01861]	ヒンジのための IMGT固有番号 付け ^a	IMGTエキソ ン番号付け ^a	E U 番号付け	K a b a t 番号付け
(E)	1	1	216	226
S	2	2	217	227
K	3	3	218	228
Y	4	4	- ^a (219) ^b	229
G	5	5	- ^a (220) ^b	230
P	6	6	224	237
P	7	7	225	238
C	8	8	226	239
P	9	9	227	240
S	10	10	228	241
C	11	11	229	242
P	12	12	230	243

10

【 0 1 6 5 】

【表 6】

20

表 F : I g G 4 ・ C ードメインのヒンジ番号付け

I g G 4 (I G H G 4) アミノ酸 [Swiss Prot P01861]	E U 番号付け	K a b a t 番号付け
(A)	231	244
P	232	245
E	233	246
F	234	247
L	235	248
G	236	249

30

エキソン素プライシングから生じるアミノ酸はカッコの中に示される。

ーは、対応する番号が報告されていないことを意味する。

ーーは、この位置には対応するアミノ酸がないことを意味する。

^a 最後に更新された I G M T 科学チャートに従う番号付け。

^b K a b a t, E A, ら 1991 に報告された E U インデックスに従う番号付け。

例えば、L e f r a n c, M. - P ら, *Devel Comp Immunol*, 29, 185-203 (2005); 及び E d e l m a n, G. M. ら. *PNAS USA*, 63: 78-85 (1969) も参照されたい。

40

【 0 1 6 6 】

例えば予め定められた抗原または F c γ R に対する抗体、I g、抗体結合性断片、または F c 含有タンパク質の結合に関する「結合」の用語は、典型的には、最小限二つの実体、または分子構造の間の相互作用または会合、例えば抗体 - 抗原相互作用、または F c γ R に対する F c 含有タンパク質の会合を意味する。

【 0 1 6 7 】

50

例えば、リガンドとして抗原またはFcR、及びアナライト（または抗リガンド）として抗体、Ig、抗体結合性断片、またはFc含有タンパク質を用いたBIAcore 3000装置での表面プラズモン共鳴（SPR）技術により測定したときに、典型的には、結合親和性は約 10^{-7} M以下、例えば約 10^{-8} M以下、例えば約 10^{-9} M以下の K_D 値に対応する。従って、抗体または他の結合性タンパク質は、予め定められた抗原または受容体に対して、非特異的抗原（例えばBSA、カゼイン）に対する結合についてのその親和性より少なくとも10倍低い K_D 値、例えば少なくとも100倍低く、例えば、少なくとも1,000倍低く、例えば少なくとも10,000倍低く、例えば少なくとも100,000倍低い K_D 値に対応する親和性で結合する。

【0168】

本明細書中で使用されるとき、「 K_D 」（M）の用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数、またはFcγRに対する抗体、Ig、抗体結合性断片、またはFc含有タンパク質の解離平衡定数意味する。 K_D と結合親和性の間には逆関係が存在し、従って、 K_D 値が小さいほど親和性は高い（即ち、より強い）。従って、「より高い親和性」または「より強い親和性」の用語は、相互作用を形成するより高い能力、従ってより小さい K_D 値に関し、逆に「より低い親和性」または「より弱い親和性」の用語は、相互作用を形成するためのより低い能力、従ってより大きな K_D 値に関する。幾つかの状況において、前記分子（例えば抗体）の相互作用パートナー分子（例えば受容体Y）に対する結合親和性に比較して、特定の分子（例えば抗体）のその相互作用パートナー分子（例えば受容体X）に対するより高い結合親和性（または K_D ）は、より大きい K_D 値（より低い、または弱い親和性）をより小さい K_D （より高く、またはより強い親和性）で除することにより決定される結合比として表すことができ、例えば、場合によっては5倍または10倍大きい結合親和性として表される。

【0169】

本明細書で使用するとき、「 k_d 」（sec⁻¹、または1/s）の用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数、またはFcγRに対する抗体、Ig、抗体結合性断片またはFc含有タンパク質の解離速度乗数を意味する。前記値はまた、 k_{off} 値とも称される。

【0170】

本明細書で使用するとき、用語「 k_a 」（M⁻¹×sec⁻¹、または1/M）は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数、またはFcγRに対する抗体、Ig、抗体結合性断片、またはFc含有タンパク質の会合速度定数を意味する。

【0171】

本明細書で使用する「 K_A 」（M⁻¹または1/M）の用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合平衡定数、またはFcγRに対する抗体、Ig、抗体結合断片、またはFc含有タンパク質の会合平衡定数を意味する。会合平衡定数は、 k_a を k_d で除することにより得られる。

【0172】

本明細書で使用する「EC₅₀」または「EC₅₀」の用語は、ベースラインと指定された露出時間後の最大値の間の中間の応答を誘発する抗体濃度を含む最大有効濃度の半分を意味する。EC₅₀は本質的に、その最大効果の50%が観察される抗体濃度を表す。従って、増大したEC₅₀または半最大有効濃度値では、低下した結合が観察される。

【0173】

一実施形態において、減少した結合性は、半最大量の標的細胞への結合を可能にする増大したEC₅₀抗体濃度として定義することができる。

【0174】

幾つかの実施形態において、減少したADCCまたはCDCのような細胞傷害活性は、標的細胞の半最大量の溶解を可能にする増大したEC₅₀抗体濃度として定義することができる。細胞傷害性はまた、細胞傷害性パーセント、またはカルセイン放出アッセイまたは同等のアッセイで溶解した細胞として観察される細胞総集団の割合である溶解パーセン

10

20

30

40

50

トとして測定される。パーセント細胞傷害性は、実施例 6 に記載したようにして測定することができる。

【0175】

他の実施形態において、減少した増殖は、標的細胞の半最大半量の増殖を可能にする増大した EC_{50} 抗体濃度として定義することができる。

【0176】

本明細書で使用する時、「エフェクター機能」の用語は、FcγR への結合に際して Fc 含有タンパク質により与えられる機能的能力を含むことが意図されている。如何なる理論にも拘束されるものではないが、FcγR の FcγR 複合体の形成は、種々のエフェクター細胞を結合した抗原の部位に動員し、典型的には、細胞内での種々の信号伝達事象及び後続の重要な免疫応答を生じる。

【0177】

本発明のキメラ Fc を含む抗原結合性タンパク質及び抗体は、対応する野生型 Fc 含有抗原結合性タンパク質または抗体と比較して、改変もしくは低下したエフェクター機能を示す。例えば、その全体を本明細書の一部として援用する 2014 年 8 月 7 日公開の PCT 公開番号 WO2014/121087 を参照されたい。

【0178】

幾つかの実施形態において、低下または変更されるエフェクター機能は、細胞傷害性エフェクター機能、例えば、細胞傷害性、補体依存性細胞傷害性 (CDC)、または抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) である。一実施形態では、前記低下または変更されるエフェクター機能は、補体依存性細胞傷害性である。別の実施形態では、前記低下または変更されるエフェクター機能は、抗体依存性細胞傷害性である。他の実施形態では、前記低下または変更されるエフェクター機能は、標的細胞の細胞増殖である。

【0179】

幾つかの抗体エフェクター機能は、一般的な免疫グロブリンの定常領域 (具体的には、CH2 及び CH3 ドメイン) における抗体の Fc 領域に結合する Fc 受容体 (FcR) によって、少なくとも部分的に媒介される。異なるクラスの免疫グロブリン、即ち、IgG、IgE、IgA、IgM、及び IgD に特異的な多くの Fc 受容体が存在する。ヒト IgG・Fc 受容体ファミリーは三つの群、即ち、高い親和性で IgG と結合できる FcγRI (CD64)、両者とも低親和性受容体である FcγRII (CD32) 及び FcγRIII (CD16) に分けられる。二つまたは三つの遺伝子によりコードされる各 FcγR サブクラス、及び選択的 RNA 素プライシングは複数の転写物を導き、従って FcγR における広範な多様性が存在する (例えば、FcγRIIA (CD64; FCGR1A)、FcγRIIB (CD64; FCGR1B)、FcγRIIIA (CD32A; FCGR2A)、FcγRIIIB (CD32B; FCGR2B)、FcγRIIC (CD32C; FCGR2C)、FcγRIIIIA (CD16a; FCGR3A)、及び FcγRIIIIB (CD16b; FCGR3B))。加えて、FcRn または新生児 Fc 受容体 (Fc 受容体トランスポーター、アルファ、または FCGR4 としても知られる) は、胎盤を横切って母親から胎児へと IgG 抗体を移送することができる。更に、Fc 受容体は、例えば B 細胞、単球、樹状細胞、好中球、及び一定のリンパ球を含む、種々の細胞に発現される。例えば U937 細胞、即ち、ヒト単球細胞株は、FcγRI 及び FcγRIIIA の両方を発現した (例えば Jones ら、J Immunol 135 (5): 3348-53 (1985); 及び Brooks ら、J Exp Med 170: 1369-85 (1989 年 10 月) を参照されたい)。本明細書で言及する各受容体には、転写変異体、アイソフォーム及び多型を含んだ、該受容体の何れか既知の機能的形態が含まれる。

【0180】

IgFc のその受容体への結合は、これらのエフェクター細胞を、結合された抗原の部位へともたらし、最終的には、B 細胞活性化、炎症反応、細胞傷害性応答、及び食細胞応答を含む種々のシグナル伝達及び免疫応答を生じる。このように、IgFc のその受容体への低下または変化した結合は、低下したエフェクター機能を生じる可能性がある。

【0181】

「抗体依存性細胞食作用」または「ADCP」の用語は、細胞溶解を誘導するのではなく、標的細胞を飲み込むことにより標的細胞を排除する（または致死させる）エフェクター機能に関する。ADCPは、腫瘍細胞を死滅させるための重要なインビボ機構であり得る。ADCPは、二色蛍光フローサイトメトリー法によって測定することができ、例えば、PKH2（緑色蛍光色素）及び異なる細胞表面タンパク質に対するフィコエリトリン接合（赤）モノクローナル抗体を利用して試験細胞を識別し、食細胞活性及び食作用速度を決定する方法を利用することができる。ADCPの測定は、当技術分野において周知である。FcγRIIBに対してFcγRIIAを選択的に活性化させる治療戦略は、マクロファージ食作用活性を高めることができる（Richards, J Oら, 2008 Mol Cancer Ther 7(8): 2517-27）。本発明のキメラFcを含有する抗原結合性タンパク質は、ヒトFcγRIIAに結合してこれを活性化させる。一定の状況では、本発明の抗原結合性タンパク質及び抗体は、該抗体がヒトFcγRIIBに結合するよりも高い結合親和性で、ヒトFcγRIIAに結合する。幾つかの実施形態において、該抗体は、ヒトFcγRIIAに対して、ヒトFcγRIIBに対するその結合親和性よりも約5超強い結合親和性を示し、かかる結合親和性の値は K_D で表される。他の実施形態において、該抗体はヒトFcγRIIAに対して、ヒトFcγRIIBに対するその結合親和性よりも約6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、または20倍強い結合親和性を示す。

10

20

【0182】

<抗体及び二重特異的抗原結合性分子の生物学的特性>

本発明には、そのヒトCD3及びCD20抗体に結合する抗体及びその抗原結合性断片が含まれる。例えば、本発明には、本明細書の実施例3に定義されたアッセイフォーマット（例えば、CD3×CD20抗体に対するJurkat細胞またはRaji細胞の結合を評価する）または実質的に類似のアッセイを使用して、インビトロ結合アッセイにより測定したときに、約60 nM未満の EC_{50} でJurkat細胞（CD3+）及びRaji細胞（CD20+）に結合する抗CD3×CD20抗体が含まれる。一定の実施形態において、本発明の抗体または抗原結合性断片は、例えば、本明細書の実施例4で定義されたアッセイ、または実質的に同様のアッセイのようなアッセイフォーマット形式を使用してインビトロ結合アッセイにより測定されたときに、約75 nM未満、約70 nM未満、約65 nM未満、約60 nM未満、約50 nM未満、約40 nM未満、約30 nM未満、または約25 nM未満の EC_{50} で、細胞（例えば、Jurkat細胞及び/またはRaji細胞）の表面上のCD3またはCD20に結合する。

30

【0183】

本発明には、ヒトCD3及びヒトCD20に同時に結合できる二重特異的抗原結合性分子（例えば、二重特異的抗体）が含まれる。一定の実施形態によれば、本発明の二重特異的抗原結合性分子は、CD3及び/またはCD20を発現する細胞と特異的に相互作用する。二重特異的抗原結合性分子が、CD3及び/またはCD20を発現する細胞に結合する程度は、本明細書の実施例4に示すように、蛍光活性化細胞選別（FACS）によって評価することができる。例えば、本発明には、CD3を発現するヒトT細胞株（例えば、ジャーカット）、CD20を発現するヒトB細胞株（例えば、Raji細胞）、及び霊長類T細胞（例えば、カニクイザル末梢血単核細胞[PBMC]）に特異的に結合する二重特異性の抗原結合性分子が含まれる。本発明は、実施例4に記載したFACSアッセイまたは実質的に同様のアッセイを使用して決定したときに、約 8.74×10^{-6} ~ 約 5.99×10^{-8} の EC_{50} で前述の細胞及び細胞株の何れかに結合する二重特異的抗原結合性分子を含むものである。

40

【0184】

本発明にはまた、ヒトCD3に結合して、T細胞に媒介された腫瘍細胞死滅を誘導する抗体、及びその抗原結合性断片が含まれる。例えば、本発明には、本明細書で実施例5に

50

定義されたアッセイフォーマットを使用したインビトロでのT細胞媒介腫瘍細胞死滅アッセイ（例えば、抗CD3抗体の存在下に、ヒトPBM CによるRaji腫瘍細胞死滅の程度を評価する）、または実質的に類似のアッセイで測定したときに、約60 p M未満のEC₅₀でT細胞媒介性の腫瘍細胞死滅を誘導する抗CD3×CD20抗体が含まれる。一定の実施形態において、本発明の抗体または抗原結合性断片は、例えば本明細書の実施例5に定義されたアッセイフォーマット、または実質的に類似のアッセイを使用したしてインビトロのT細胞媒介性腫瘍細胞死滅アッセイにより測定したときに、約56 p M未満、約50 p M未満、約45 p M未満、約40 p M未満、約35 p M未満、約30 p M未満、約25 p M未満、約20 p M未満、約15 p M未満、約10 p M未満、約5 p M未満、または約1 p M未満のEC₅₀で、T細胞媒介性の腫瘍細胞死滅（例えば、PBM C媒介性のRaji細胞の死滅）を誘導する。

10

【0185】

本発明はまた、野生型IgG・Fcドメインを有する抗体よりも程度は低いが、ヒトCD3/CD20に結合して補体依存性細胞傷害（CDC）を誘導する抗体及びその抗原結合性断片を含むものである。例えば、本発明には、本明細書の実施例6に定義したアッセイフォーマット（例えば、補体及び抗CD3×CD20抗体の存在において標的細胞殺滅（RajiまたはDaudi）の程度を評価する）、または実質的に類似のアッセイを使用して、インビトロのT細胞媒介性腫瘍細胞殺滅アッセイで測定したときに、約50%未満のパーセント細胞傷害性（%細胞傷害性または%細胞溶解）でRaji細胞またはDaudi細胞（CD20を発現する）のCDC死滅を誘導する、抗CD3×CD20抗体が含まれる。一定の実施形態において、本発明の抗体または抗原結合断片は、例えば本明細書の実施例6に定義したアッセイフォーマット、または実質的に類似のアッセイを使用してインビトロの補体媒介性細胞死滅アッセイにより測定したときに、約45%未満、約40%未満を、約35%未満、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約1%未満、バックグラウンド細胞傷害性未満、または検出不能な細胞傷害性のパーセント細胞傷害性で、CDC細胞の死滅（例えば、Raji細胞またはDaudi細胞の補体媒介性の死滅）を誘導する。

20

【0186】

本発明にはまた、ヒトCD3/CD20に結合するが、野生型IgG・Fcドメインを有する抗体に比較して抗体依存性の細胞媒介性傷害（ADCC）を有意に誘導しない抗体及びその抗原結合性断片が含まれる。例えば、本発明には、本明細書の実施例7に定義したアッセイフォーマット（例えばNK細胞及び抗CD3×CD20抗体の存在において標的細胞殺滅[RajiまたはDaudi]の程度を評価する）、または実質的に類似のアッセイを使用して、インビトロNK細胞媒介性の細胞殺滅アッセイで測定したときに、約20%未満（またはバックグラウンド細胞傷害性未満）のパーセント細胞傷害性（%細胞傷害性または%細胞溶解性）でのRaji細胞またはDaudi細胞の明らかな死滅を伴わない、抗CD3×CD20抗体が含まれる。実質的に類似のアッセイは、NK細胞、マクrophage、好中球、好酸球、または変異体FcγRIIIを発現する細胞を含む他のFcγRIII発現細胞の存在を含むことができる。一定の実施形態において、本発明の抗体または抗原結合性断片は、例えば本明細書の実施例7で定義されたアッセイフォーマット、または実質的に同様のアッセイを使用して、インビトロFcγRIIIに媒介された細胞死滅アッセイにより測定したときに、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約1%未満、バックグラウンド細胞傷害性未満のパーセント細胞傷害性で、検出可能なADCC活性（例えばNK細胞、またはRaji細胞またはDaudi細胞のFcγRIII媒介性死滅）を示さず、または検出可能な細胞傷害活性を示さない。

30

40

【0187】

一定の実施形態に従えば、本発明には、本明細書の実施例8において定義したアッセイフォーマットを使用して表面プラズモン共鳴により測定したときに、（例えば25において）約23.5 μ M未満のK_DでヒトFcγRIIAに結合する抗体及び抗体の抗原結

50

合性断片が含まれる。一定の実施形態において、本発明の抗体または抗原結合性断片は、本明細書の実施例 8 において定義したアッセイフォーマット（例えば、mAb 捕獲または抗原捕獲フォーマット）、または実質的に類似のフォーマットを使用して表面プラズモン共鳴により測定したときに、約 20 . 5 μ M 未満、約 20 μ M 未満、約 19 . 3 μ M 未満、約 18 μ M 未満、約 17 μ M 未満、約 16 μ M 未満、約 15 μ M 未満、約 10 μ M 未満、約 9 μ M 未満、約 8 μ M 未満、約 7 μ M 未満、約 6 μ M 未満、約 5 μ M 未満、約 4 μ M 未満、約 3 μ M 未満、約 2 μ M 未満、約 1 μ M 未満、約 900 nM 未満、約 800 nM、または約 700 nM 未満の K_D でヒト Fc γ RIIA に結合する抗体及び抗体の抗原結合性断片が含まれる。

【0188】

一定の実施形態に従えば、本発明には、本明細書の実施例 8 において定義したアッセイフォーマットを使用して表面プラズモン共鳴により測定したときに、（例えば 25 において）約 233 μ M 未満の K_D でヒト Fc γ RIIB に結合する抗体及び抗体の抗原結合性断片が含まれる。一定の実施形態において、本発明の抗体または抗原結合性断片は、本明細書の実施例 8 において定義したアッセイフォーマット（例えば、mAb 捕獲または抗原捕獲フォーマット）、または実質的に類似のフォーマットを使用して表面プラズモン共鳴により測定したときに、約 200 μ M 未満、約 190 μ M 未満、約 180 μ M 未満、約 170 μ M 未満、約 160 μ M 未満、約 150 μ M 未満、約 140 μ M 未満、約 130 μ M 未満、約 125 μ M 未満、約 123 μ M 未満、約 120 μ M 未満、約 110 μ M 未満、約 100 μ M 未満、約 90 μ M 未満、約 80 μ M 未満、約 70 μ M 未満、約 60 μ M 未満、約 50 μ M 未満、約 40 μ M 未満の K_D でヒト Fc γ RIIB に結合する抗体及び抗体の抗原結合性断片が含まれる。

【0189】

本発明にはまた、本明細書の実施例 9 に記載のアッセイフォーマット、または実質的に類似のアッセイを使用して、25 または 37 での表面プラズモン共鳴により測定したときに、約 8 日超の解離半減期（ $t_{1/2}$ ）で CD3 $\times$ CD20 に結合する抗体及びその抗原結合性断片が含まれる。一定の実施形態において、当該抗体は、本明細書の実施例 9 において定義したアッセイフォーマット（例えば、mAb 捕獲または抗原捕獲フォーマット）、または実質的に類似のフォーマットを使用して、25 または 37 での表面プラズモン共鳴により測定したときに、約 5 日超、6 日超、約 7 日超、約 8 日超、約 9 日超、約 10 日超、約 11 日超、約 12 日超、約 13 日超、約 14 日超、約 15 日超、または約 20 日超の $t_{1/2}$ を示す。

【0190】

本発明はまた、（a）インビトロで PBMC 増殖を誘導すること；（b）CDC 細胞傷害性（例えば本明細書の実施例 6 参照）；（d）ADCC（例えば本明細書の実施例 7 参照）からなる群から選択される 1 以上のアッセイにおいて、実質的な活性を示さない抗 CD3 / 抗 CD20 二重特異的抗原結合性分子を包含する。

【0191】

本発明はまた、（a）カニクイザルにおける B 細胞（例えば、CD45 + / CD20 + B 細胞）の枯渇（例えば、本明細書の実施例 10 及び 11 参照）；（b）免疫不全マウスモデルにおける B 細胞腫瘍体積（例えば、ラージ腫瘍体積）の減少（例えば、実施例 12 A 参照）；及び（c）確立された腫瘍を有するマウスモデルにおける腫瘍の退縮（例えば、実施例 12 B 参照）からなる群から選択される 1 以上のアッセイにおいて実質的な活性を示す、抗 CD3 / 抗 CD20 二重特異的抗原結合性分子を包含する。

【0192】

本発明には、被験者において B 細胞を枯渇させることができる抗 CD3 / 抗 CD20 二重特異的抗原結合性分子が含まれる（例えば実施例 10 参照）。例えば、一定の実施形態に従えば、抗 CD3 / 抗 CD20 二重特異的抗原結合性分子が提供され、ここでの二重特異的抗原結合性分子の単回投与（約 1 mg / kg、約 0 . 9 mg / kg、約 0 . 8 mg / kg、約 0 . 7 mg / kg、約 0 . 6 mg / kg、約 0 . 5 mg / kg、約 0 . 4 mg /

10

20

30

40

50

kg、約0.3mg/kg、約0.2mg/kg、約0.1mg/kg、約0.08mg/kg、約0.06mg/kg、約0.04mg/kg、約0.03mg/kg、約0.02mg/kg、約0.01mg/kg、またはそれ以下の用量)は、被験者におけるB細胞数(例えば、被験体から採取した血液サンプルにおける)の検出可能なレベル未満への減少を生じる。一定の実施形態において、前記抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子の単回投与は、約0.1mg/kgの用量において、前記二重特異的抗原結合性分子の投与後の約7日、約6日、約5日、約4日、約3日、約2日、または約1日までに、記被験者におけるB細胞数の検出可能なレベル未満への減少を生じる。一定の実施形態において、前記抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子の単回投与は、約0.01mg/kgの用量において、前記二重特異的抗原結合性分子の投与後の約7日、約8日、約9日、約10日、約11日、約12日、約13日、約14日、約15日、約16日、約17日、またはそれ以上まで、記被験者におけるB細胞数の検出可能なレベル未満に維持させる。本明細書で使用されるとき、「検出可能なレベル未満」の表現は、標準的なB細胞検出アッセイ、例えば本明細書の実施例10に記載したようなB細胞マーカーのためのFACSアッセイを使用して、被験者から採取した血液中にB細胞を直接または間接的に検出できないことを意味する。

10

【0193】

本発明はまた、被験体に投与された場合に、T細胞における一過性の減少以上を生じない、抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子を提供する。例えば、約0.01mg/kg、または約0.1mg/kg、または約1mg/kgの用量で対象に投与された場合に、投与後第1日にはT細胞数を減少させるが、その後の時点(例えば約第2日、第4日、第7日、第14日、第28日またはそれ以降までに)では血液1マイクロリットル当たりのT細胞数をリバウンドさせる抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子が提供される。例えば、本発明は、本明細書の実施例10に記載した標準的なT細胞検出アッセイ、例えばT細胞マーカーのFACSアッセイを用いて検出したときに、前記抗原結合性分子を約0.01mg/kg、または約0.1mg/kg、または約1mg/kgの用量で前記被験者に投与した約4日～約7日後の時点で被験者から採取された血液1マイクロリットル当たりのT細胞の数が、前記二重特異的抗原結合性分子の投与前に前記患者から採取された血液のマイクロリットル当たりのT細胞数以上である、抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子を提供する。

20

30

【0194】

<エピトープマッピング及び関連技術>

本発明の抗原結合性分子が結合するCD3またはCD20上のエピトープは、CD3タンパク質の3以上(例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上)のアミノ酸の単一の連続配列からなり得るものである。或いは、該エピトープは、CD3またはCD20の複数の非連続的なアミノ酸(またはアミノ酸配列)からなることもあり得る。本発明の抗体は、単一のCD3鎖(例えば、CD3イプシロン、CD3デルタまたはCD3ガンマ)内に含まれるアミノ酸と相互作用することができ、または2以上の異なるCD3鎖のアミノ酸と相互作用することができる。本明細書で使用する「エピトープ」の用語は、パラトープとして知られる抗体分子の可変領域中の特定の抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を意味する。単一の抗原は、複数のエピトープを有することができる。従って、異なる抗体は、抗原上の異なる領域に結合してよく、また異なる生物学的効果を有することができる。エピトープは高次構造または線状の何れであってもよい。高次構造エピトープは、直鎖状ポリペプチド鎖の異なるセグメントからの空間的に並置されたアミノ酸によって生成される。線状エピトープは、ポリペプチド鎖において隣接するアミノ酸残基により生成されたものである。一定の状況において、エピトープは、前記抗原上の糖部分、ホスホリル基、またはスルホニル基を含んでいてよい。

40

【0195】

50

当業者に知られている種々の技術を、抗体の抗原結合性ドメインがポリペプチドまたはタンパク質内の1以上のアミノ酸と相互作用するか否かを決定するために使用することができる。典型的な技術には、例えばハーロウ(Harlow)及びレーン(Lane)著の抗体(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)に記載されたようなルーチンの交差ブロッキングアッセイ、アラニン走査変異解析、ペプチドプロット解析(Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248: 443-463)、及びペプチド切断解析が含まれる。加えて、エピトープ切除、エピトープ抽出及び抗原の化学修飾などの方法を用いることができる(Tomer, 2000, Protein Science 9: 487-496)。抗体の抗原結合性ドメインが相互作用するポリペプチド内のアミノ酸を同定するために使用し得る別の方法は、質量分析によって検出される水素/重水素交換である。一般的に言えば、水素/重水素交換法は、興味あるタンパク質を重水素で標識し、続いてこの重水素標識されたタンパク質に抗体を結合させることを含んでいる。次に、該タンパク質/抗体複合体は水に移されて、前記抗体で保護された残基(これは重水素で標識されたまま残る)を除く全ての残基において、水素-重水素交換を生じさせる。前記抗体の解離後に、標的タンパク質はプロテアーゼ開裂及びマスマススペクトル解析に掛けられ、それによって前記抗体が相互作用する特定のアミノ酸に対応する重水素標識された残基が明らかにされる。例えば、文献[Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2): 252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A]を参照のこと。抗原/抗体複合体のX線結晶学もまた、エピトープマッピングのため使用され得る。

10

20

【0196】

本発明には更に、本明細書に記載の特異的な例示抗体(例えば、本明細書の表1に記載のアミノ酸配列の何れかを含む抗体)の何れかと同じエピトープに結合する抗CD3抗体が含まれる。同様に、本発明はまた、CD3への結合について本明細書に記載の特異的な例示抗体(例えば、本明細書の表1に記載のアミノ酸配列の何れかを含む抗体)の何れかと競合する抗CD3抗体を含む。

【0197】

本発明にはまた、ヒトCD3に特異的に結合する第一の抗原結合性ドメイン、及びヒトCD20に特異的に結合する第二の抗原結合性ドメインを備えた二重特異的抗原結合性分子が含まれ、ここでの前記第一の抗原結合性ドメインは、本明細書に記載の特定の典型的なCD3特異的抗原結合性ドメインと同じCD3上のエピトープに結合し、及び/または前記第二の抗原結合性ドメインは、本明細書に記載の特定の典型的なCD20特異的抗原結合性ドメインと同じCD20上のエピトープに結合する。

30

【0198】

同様に、本発明にはまた、ヒトCD3に特異的に結合する第一の抗原結合性ドメイン、及びヒトCD20に特異的に結合する第二の抗原結合性ドメインを備えた二重特異的抗原結合性分子が含まれ、ここでの前記第一の抗原結合性ドメインは、CD3への結合について、本明細書に記載の特定の典型的なCD3特異的抗原結合性ドメインと競合し、及び/または前記第二の抗原結合性ドメインは、CD20への結合について、本明細書に記載の特定の典型的なCD20特異的抗原結合性ドメインと競合する。

40

【0199】

一つの態様において、本発明には、第一の抗原結合性ドメインがヒトCD3への結合について参照抗原結合性タンパク質と競合する二重特異的抗体が含まれ、前記タンパク質は三つの重鎖相補性決定領域(A1-HCDR1、A1-HCDR2及びA1-HCDR3)及び三つの軽鎖相補性決定領域(A1-LCDR1、A1-LCDR2及びA1-LCDR3)を備えており、ここで(i)A1-HCDR1は配列番号12のアミノ酸配列を含み、(ii)A1-HCDR2は配列番号14のアミノ酸配列を含み、(iii)A1-HCDR3は配列番号16のアミノ酸配列を含み、(iv)A1-LCDR1は配列番号20のアミノ酸配列を含み、(v)A1-LCDR2は配列番号22のアミノ酸配列を

50

含み、(v i) A 1 - L C D R 3 は配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む。幾つかの場合において、該二重特異的抗体は、ヒト C D 3 への結合について参照抗原結合性タンパク質と競合する第一の抗原結合性ドメインを具備し、前記タンパク質は (i) 配列番号 1 0 の重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列、及び (i i) 配列番号 1 8 の軽鎖可変領域 (L C V R) アミノ酸配列を含んでいる。

【0200】

別の態様において、本発明には、第二の抗原結合性ドメインがヒト C D 2 0 への結合について参照抗原結合性タンパク質と競合する二重特異的抗体が含まれ、前記タンパク質は三つの重鎖相補性決定領域 (A 2 - H C D R 1、A 2 - H C D R 2 及び A 2 - H C D R 3) 及び三つの軽鎖相補性決定領域 (A 2 - L C D R 1、A 2 - L C D R 2 及び A 2 - L C D R 3) を備えており、ここで (i) A 2 - H C D R 1 は配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、(i i) A 2 - H C D R 2 は配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、(i i i) A 2 - H C D R 3 は配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、(i v) A 2 - L C D R 1 は配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含み、(v) A 2 - L C D R 2 は配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含み、(v i) A 2 - L C D R 3 は配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む。幾つかの場合において、該二重特異的抗体は、ヒト C D 2 0 への結合について参照抗原結合性タンパク質と競合する第二の抗原結合性ドメインを具備し、前記タンパク質は (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (H C V R) 及び (i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (L C V R) を含んでいる。

10

【0201】

別の態様において、本発明には、ヒト C D 3 への結合について、(i) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (H C V R) 及び (i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (L C V R) を備えた参照抗原結合性タンパク質と競合する第一の抗原結合性ドメインを有し；またヒト C D 2 0 への結合について、(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (H C V R) 及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (L C V R) を備えた参照抗原結合性タンパク質と競合する第二の抗原結合性ドメインを有する二重特異的抗体が含まれる。

20

【0202】

特定の抗原結合性分子 (例えば、抗体) またはその抗原結合性ドメインが、本発明の参照抗原結合性分子と同じエピトープに結合するかどうか、またはその使用により、本発明の参照抗原結合性分子と同じエピトープに結合するかどうか、または前記参照分子との結合について競合するかどうかは、当該技術において知られたルーチンの方法によって容易に決定することができる。例えば、試験抗体が本発明の二重結合性の基準抗原結合性分子と同じ C D 3 (または C D 2 0) 上のエピトープに結合するかどうかを決定するために、前記参照二重結合性分子は、先ず C D 3 タンパク質 (または C D 2 0 タンパク質) に結合される。次に、試験抗体が C D 3 (または C D 2 0) 分子に結合する能力が評価される。もし、前記二重結合性の基準抗原結合性分子との飽和結合の後に、前記試験抗体が C D 3 (または C D 2 0) に結合できるならば、前記試験抗体は、前記二重特異性の基準抗原結合性分子よりも、C D 3 (または C D 2 0) の異なるエピトープに結合すると結論することができる。一方、前記試験抗体が、前記二重結合性の基準抗原結合性分子との飽和結合の後に C D 3 (または C D 2 0) に結合できないならば、前記試験抗体は、本発明の前記二重結合性の基準抗原結合性分子により結合されるエピトープと同じ C D 3 (または C D 2 0) のエピトープに結合する可能性がある。次いで、試験抗体の観察された結合性欠如が、実施兄塩基二重結合性の基準抗原結合性分子と同じエピトープへの結合性によるものか、または立体的ブロッキング (または別の現象) が観察された結合性の欠如の理由なのかどうかを確認するために、更なるルーチンの実験 (例えば、ペプチド変異及び結合解析) を実施することができる。この種の実験は、E L I S A、R I A、ピアコア、フローサイトメトリーまたは当技術において利用可能な他の任意の定量的または定性的な抗体結合アッセイを使用して行うことができる。本発明の一定の実施形態に従えば、競合結合アッセイで測定したときに、例えば 1 倍、5 倍、1 0 倍、2 0 倍、または 1 0 0 倍過剰の一方

30

40

50

の抗原結合性タンパク質が、他方の結合を少なくとも50%、好ましくは75%、90%または更に99%阻害するならば、二つの抗原結合性タンパク質は同じ（または重畳する）エピトープに結合する（例えば、Jung et al., Cancer Res. 1990; 50: 1495-1502 参照）。或いは、一方の抗原結合性タンパク質の結合を低減または排除する抗原における実質的に全てのアミノ酸変異が、他方の結合性を低減または排除するならば、二つの抗原結合性タンパク質は同じエピトープに結合すると考えられる。もし、一方の抗原結合性タンパク質の結合性を低減または排除するアミノ酸変異のサブセットのみが、他方の結合性を低減または排除するのであれば、二つの抗原結合性タンパク質は「重畳するエピトープ」を有すると考えられる。

【0203】

抗体または抗原結合ドメインが、その参照抗原結合性分子との結合について競合するかどうかを決定するために、二つの配向で上記の結合方法が実行される：第一の配向において、前記参照抗原結合性分子が飽和条件下でCD3タンパク質（またはCD20タンパク質）に結合され、続いて試験抗体のCD3（またはCD20）分子への結合の評価が行われる。第二の配向において、前記試験抗体は飽和条件下でCD3（またはCD20）分子に結合され、続いて前記参照抗原結合性分子のCD3（またはCD20）分子への結合が評価される。もし、両方の配向において、第一（飽和性）の抗原結合性分子のみがCD3（またはCD20）に結合できるならば、前記試験抗体及び参照抗原結合性分子はCD3（またはCD20）への結合について競合すると結論される。当業者が理解するように、参照抗原結合性分子との結合について競合する抗体は、必ずしも前記参照分子と同じエピトープには結合せず、重畳または隣接するエピトープに結合することによって前記参照抗体の結合を立体的にブロックする可能性がある。

【0204】

< 抗原結合性ドメインの調製及び二重特異的分子の構築 >

特定の抗原に対して特異的な抗原結合性ドメインは、当技術分野において知られた任意の抗体作製技術により調製することができる。一旦得られたら、二つの異なる抗原（例えばCD3及びCD20）に特異的な二つの異なる抗原結合性ドメインは、ルーチンの方法を使用して本発明の二重特異的抗原結合性分子を製造するために、相互に適切に配置することができる。（本発明の二重特異的抗原結合性分子を構築できる例示的な二重特異的抗体フォーマットの議論は、本明細書の他の箇所に提供される）。一定の実施形態において、本発明の多重特異的な抗原結合性分子の個々の成分（例えば、重鎖及び軽鎖）の1以上は、キメラ抗体、ヒト化抗体または完全なヒト抗体に由来する。そのような抗体を作製するための方法は、当該分野において周知である。例えば、本発明の二重特異的抗原結合性分子の1以上の重鎖及び/または軽鎖は、VELOCE IMMUNE（商標）の技術を用いて調製することができる。VELOCE IMMUNE（商標）技術を用いて、ヒト可変領域及びマウス定常領域を有する、特定の抗原（例えばCD3及びCD20）に対する高親和性のキメラ抗体が最初に単離される。該抗体は、親和性、選択性、エピトープ等を含む望ましい特性について、特徴付け及び選択される。該マウス定常領域を望ましいヒト定常領域で置換して、本発明の二重特異的抗原結合性分子に組み込むことができる完全なヒト重鎖及び/または軽鎖を作製することができる。

【0205】

遺伝子操作された動物を、ヒト二重特異的抗原結合性分子を作製するために使用することができる。例えば、再配置でき且つ内因性のマウス免疫グロブリン軽鎖化配列を発現できる遺伝子的に改変されたマウスを使用することができ、ここでの該マウスは、内因性マウスカッパ遺伝子座においてマウスカッパ定常遺伝子に動作可能にリンクされたヒト免疫グロブリン配列によりコードされる一つまたは二つのヒト軽鎖可変ドメインのみを発現する。このような遺伝子改変マウスは、二つの異なるヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントのうちの一方に由来する可変ドメインを備えた同一の軽鎖と会合する、二つの異なる重鎖を含む完全なヒト二重特異的抗原結合性分子を生成することができる。（このような改変マウスの詳細な議論及び二重特異的抗原結合性分子を生成するためのその使用については

、例えば、US 2011/0195454を参照されたい)。

【0206】

＜生物学的同等製剤＞

本発明は、本明細書に開示される典型的な分子のものと異なるが、CD3及び/またはCD20に結合する能力を保持したアミノ酸配列を有する抗原結合性分子を包含する。このような変異体分子は、親配列と比較したときに1以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含み得るが、前記で記載した二重特異的抗原結合性分子のものと実質的に等価な生物学的活性を示すことができる。

【0207】

本発明には、本明細書に記載の典型的な抗原結合性分子の何れかに対しての生物学的に同等である抗原結合性分子が含まれる。二つの抗原結合性タンパク質または抗体は、例えばそれらが医薬的同等製剤または医薬的代替物であり、同様の実験条件、単一もしくは複数の用量の下に同じモル用量で投与されたときに、それらの吸収の速度及び範囲が有意な差を示さないならば、それらは生物学的同等製剤であると看做される。幾つかの抗原結合性タンパク質は、それらが吸収の範囲において同等であれば、それらの吸収速度において同等でないときにも同等製剤または医薬的代替物であると看做されるであろう。更に、このような吸収速度の相違は意図的で且つラベリングに反映され、例えば慢性的使用の際の有効な身体薬物濃度の達成に本質的に重要でなく、研究される特定の薬物にとって医薬的に重要でないとは看做されるので、生物学的同等製剤と看做することができる。

10

【0208】

一つの実施形態において、二つの抗原結合性タンパク質は、それらの安全性、純度、及び効力において臨床的に意味のある相違が存在しないならば、生物学的等価製剤である。

20

【0209】

一つの実施形態において、参照製品と生物学的製剤との間での切り替えを伴わずに続けられた治療と比較して、免疫原性の臨床的に有意な変化または減少した有効性を含む副作用リスクの予想される増加を伴わずに、参照製品と生物学的製剤との間で1回以上切り替えることができる場合には、二つの抗原結合性タンパク質は生物学的に同等である。

【0210】

一つの実施形態において、二つの抗原結合タンパク質は、それらの両者が使用の条件(複数可)について共通の作用機序(複数可)により作用する場合には、このようなメカニズムが知られている範囲で生物学的に同等である。

30

【0211】

生物学的同等性は、インビボ及びインビトロの方法により実証することができる。生物学的同等性の測定には、例えば、(a)抗体またはその代謝産物の濃度が、血液、血漿、血清、または他の生物学的液体において時間の関数として測定される、ヒトまたは他の哺乳動物におけるインビボ試験；(b)ヒトのインビボでの生物学的利用能のデータと相関しており、合理的に該利用能を予測させるインビトロ試験；(c)抗体(またはその標的)の適切な急性薬理効果が時間の関数として測定される、ヒトまたは他の哺乳動物におけるインビボ試験；(d)抗原結合タンパク質の安全性、有効性、または生物学的利用能または生物学的同等性を確立するよく制御された臨床試験が含まれる。

40

【0212】

本明細書に記載された例示的な二重特異的抗原結合性分子の生物学的に同等な変異体は、例えば、残基もしくは配列の種々の置換を行うか、または生物学的活性に必要でない末端もしくは内部の残基もしくは配列の削除を行うことにより構築することができる。例えば、生物学的活性に不可欠でないシステイン残基は、還元時に不必要または不正確な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止するために、欠失または他のアミノ酸で置換することができる。他の状況において、生物学的に同等の抗原結合タンパク質には、例えば、分子のグリコシル化特性を変更するアミノ酸の変化、例えばグリコシル化を排除または除去する変異を含んだ、本明細書に記載の典型的な二重特異的抗原結合性分子の変異体が包含され得る。

50

【 0 2 1 3 】

< 種選択性及び種交差反応性 >

本発明の一定の実施形態によれば、他の種由来の C D 3 ではなく、ヒト C D 3 に結合する抗原結合性分子が提供される。また、他の種由来の C D 2 0 ではなく、ヒト C D 2 0 に結合する抗原結合性分子も提供される。本発明はまた、ヒト C D 3 及び 1 以上の非ヒト種由来の C D 3 に結合する抗原結合性分子；及び / またはヒト C D 2 0 及び 1 以上の非ヒト種由来の C D 2 0 に結合する抗原結合性分子を包含するものである。

【 0 2 1 4 】

本発明の一定の典型的な実施形態によれば、ヒト C D 3 及び / またはヒト C D 2 0 に結合し、また場合によっては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、カニクイザル、マーモセット、アカゲザルまたはチンパンジー C D 3 及び / または C D 2 0 の 1 以上に結合しても結合しなくてもよい抗原結合性分子が提供される。例えば、本発明の特定の典型的実施形態においては、ヒト C D 3 及びカニクイザル C D 3 に結合する第一の抗原結合性ドメイン、並びにヒト C D 2 0 に特異的に結合する第二の抗原結合性ドメインを具備する二重特異的抗原結合性分子が提供される。

10

【 0 2 1 5 】

< 免疫複合体 >

本発明は、細胞毒、化学療法薬、免疫抑制剤または放射性同位体のような治療部分に結合された抗原結合性分子（「免疫複合体」）を包含する。細胞傷害性剤には、細胞に有害な任意の薬剤が含まれる。免疫複合体を形成するための適切な細胞傷害性剤及び化学療法剤の例が、当該技術において知られている（例えば、W O 0 5 / 1 0 3 0 8 1 を参照されたい）。

20

【 0 2 1 6 】

< 治療用製剤及び投与 >

本明細書で使用するとき、「有効量」及び「治療的有效量」の用語は、毒性、刺激、またはアレルギー反応のような過度の有害な副作用を伴うことなく、所望の治療応答を得るのに十分な活性治療薬の量を意味する。特定の「有効量」は、明らかに、治療される特定状態、患者の身体状態、治療される動物のタイプ、治療の期間、併用療法（もしあれば）の種類、及び用いられる特異的製剤、並びに化合物もしくはその誘導体の構造のような因子と共に変化するであろう。この場合、ある量は、限定されるものではないが、（ a ）腫瘍増殖（例えば B 細胞癌）の阻害；及び（ b ） B 細胞癌の反転または安定化の 1 以上がもたらされるならば、治療的に有効と看做されるであろう。

30

【 0 2 1 7 】

患者に投与された抗原結合性分子の投与量は、患者の年齢、サイズ、対象疾患、症状、及び投与経路等に依存して変化する可能性がある。好ましい用量は、典型的には、体重または体表面積に従って計算される。本発明の二重特異的抗原結合性分子が成人患者での治療目的のために使用される場合、本発明の二重特異的抗原結合性分子は、通常は約 0 . 0 1 ~ 約 2 0 m g / k g 体重、より好ましくは、約 0 . 0 2 ~ 約 7、約 0 . 0 3 ~ 約 5、または約 0 . 0 5 ~ 約 3 m g / k g 体重の単回投与で、静脈内に投与するのが有利であり得る。状態の重症度に応じて、治療の頻度及び期間を調節することができる。二重特異的抗原結合性分子を投与するための有効投与量及びスケジュールは、経験的に決定することができる；例えば、患者の進行状況は定期的な評価によってモニターでき、それに応じて用量を調整できる。更に、投与量の種間でのスケールリングは、当該分野で周知の方法を用いて行うことができる（例えば、M o r d e n t i r a , 1 9 9 1 , P h a r m a c e u t . R e s . 8 : 1 3 5 1 ）。

40

【 0 2 1 8 】

様々な送達系が知られており、本発明の医薬組成物を投与するために使用できる：例えば、リポソーム中への封入、微粒子、マイクロカプセル、変異体ウイルスを発現し得る組換え細胞中でのカプセル化、受容体媒介エンドサイトーシスである（例えば、W u e t

50

al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429 - 4432 参照)。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口経路が含まれるが、これらに限定されない。組成物は、任意の便宜な経路によって、例えば輸液またはボラス注射によって、上皮または皮膚粘膜（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜など）を介した吸収によって投与されてよく、また、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与されてよい。投与は全身的または局所的であることができる。

【0219】

本発明の医薬組成物は、標準的な針及びシリンジを用いて、皮下または静脈内に送達することができる。加えて、皮下送達に関しては、ペン型送達装置が本発明の医薬組成物の送達において容易な適用を有する。このようなペン型送達装置は、再使用可能または使い捨てであることができる。再使用可能なペン型送達装置は、一般に、医薬組成物を含有する交換可能なカートリッジを利用する。カートリッジ内の医薬組成物が全部投与されてカートリッジが空になったら、空のカートリッジを容易に破棄し、医薬組成物を含む新しいカートリッジと交換することができる。このペン型送達装置は、再利用することができる。使い捨てのペン送達デバイスでは、交換可能なカートリッジが存在しない。使い捨てのペン型送達装置は、装置内に保持されたリザーバ内に医薬組成物を予め充填している。リザーバの医薬組成物が空になったら、装置全体が廃棄される。

10

【0220】

多数の再使用可能なペン型自動注入送達装置が、本発明の医薬組成物の皮下送達における用途を有する。例として幾つかの名前だけを挙げれば次のものが含まれるが、これらに限定されない：オートペン（商標）（オーウェン・マンフォード社、ウッドストック、UK）、DISETRONIC（商標）ペン（ディセトロニック・メディカルシステムズ社、バーグドルフ、スイス）、HUMALOGミックス75/25（商標）ペン、HUMALOG（商標）ペン、HUMALIN70/30（商標）ペン（イーライリリー社、インディアナポリス、IN）、NOVOPEN（商標）I、II及びIII（ノボノルディスク、コペンハーゲン、デンマーク）、NOVOPEN JUNIOR（商標）（ノボノルディスク、コペンハーゲン、デンマーク）、BD（商標）ペン（ベクトン・ディッキンソン社、フランクリンレイクス、NJ）、OPTIPEN（商標）、OPTIPEN PRO（商標）、OPTIPENスターレット（商標）、及びOPTICLIK（商標）（サノフィ・アベンティス、フランクフルト、ドイツ）。本発明の医薬組成物の皮下送達において用途を有する使い捨てペン型送達装置の例には、幾つかの名前だけを挙げれば次のものが含まれるが、これらに限定されない：、SOLOSTAR（商標）ペン（サノフィ・アベンティス）、FLEXPEN（商標）（ノボノルディスク）、及びKWIKPEN（商標）（イーライリリー）、SURECLICK（商標）オートインジェクタ（アムジェン社、サウザンドオークス、CA）、PENLET（商標）（ハゼルマイヤー社、シュトゥットガルト、ドイツ）、エビペン（デイ、L.P.）、及びHUMIRA（商標）ペン（アボット研究所、アボットパーク、IL）。

20

30

【0221】

一定の状況において、医薬組成物は制御放出系で送達することができる。一つの実施形態では、ポンプを使用することができる（Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 参照）。別の実施形態では、ポリマー材料を使用することができる；制御放出の医療適用、ランガー及びワイズ（編）、1974年、CRCプレス社、ボカラトン、フロリダ州を参照されたい。更に別の実施形態において、制御放出系は組成物の標的近傍に配置することができ、従って、全身用量の一部のみを必要とする（例えば、Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115 - 138を参照されたい）。他の制御放出系は、Langer, 1990, Science 249: 1527 - 1533による考察において議論されている。

40

【0222】

50

注射用製剤としては、例えば静脈内、皮下、皮内及び筋肉内注射、点滴などのための剤形が含まれてよい。これらの注射用製剤は、公知の方法により調製することができる。例えば、注射用製剤は、注射のために従来に使用されている無菌水性媒体または油性媒体中に、上述の抗体またはその塩を溶解し、懸濁させ、または乳化することによって調製することができる。注射用の水性媒体としては、例えば、生理食塩水、グルコース及び他の補助剤を含有する等張溶液があり、これらはアルコール（例えば、エタノール）、多価アルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤〔例えば、ポリソルベート 80、HCO-50（水素化ヒマシ油のポリオキシエチレン（50 モル）付加物）〕等と組み合わせて使用することができる。油性媒体としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、これらは安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の溶解補助剤と組み合わせて使用することができる。こうして調製された注射剤は、好ましくは適切なアンプル中に充填される。

10

【0223】

有利には、上述した経口または非経口で使用するための医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するように、適切な単位用量剤形に調製される。単位用量でのそのような剤形には、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが含まれる。含有される上記抗体の量は、一般に、単位用量の剤形当たり約 5 ～ 約 500 mg であり；特に、好ましくは、注射の形態では含有される上記抗体は約 5 ～ 約 100 mg であり、他の剤形については約 10 ～ 約 250 mg である。

20

【0224】

< 抗原結合性分子の治療的使用 >

本発明は、抗 CD3 抗体、または CD3 及び標的抗原（例えば、CD20）に特異的に結合する二重特異的抗原結合性分子を含有する治療用組成物を、それを必要性としている被験者に投与することを含む方法を包含する。該治療用組成物は、本明細書に開示された抗体または二重特異的抗原結合性分子、及び薬学的に許容される担体または希釈剤を含有することができる。本明細書で使用する時、「それを必要としている被験者」の表現は、癌の 1 以上の症候または兆候を呈するヒトまたは非ヒト動物（例えば、腫瘍発現し、または以下で述べる何れかの癌に罹患している被験者は）を意味し、或いは、そうでなければ CD20 活性における阻害もしくは低下、または CD20 + B 細胞の枯渇、または CD20 + B 細胞腫瘍の退縮による恩恵を受けるヒトまたは非ヒト動物を意味する。

30

【0225】

本発明の抗体及び二重特異的抗原結合性分子（及びそれを含む治療組成物）は、中でも、免疫応答を刺激し、活性化し、及び / またはターゲッティングすることが有益である任意の疾患または障害を遅漏するために有用である。特に、本発明の抗 CD3 / 抗 CD20 二重特異的抗原結合性分子は、CD20 の発現、または CD20 + B 細胞の活性もしくは増殖に関連し、またはこれによって媒介され得る疾患もしくは障害の治療、予防及び / または改善のために使用することができる。本発明の治療方法が達成される作用機序には、例えば、アポトーシス、食作用、またはこれら機構の 2 以上の組み合わせ、または同様の細胞傷害性による、エフェクター細胞の存在下での CD20 発現細胞の死滅が含まれる。本発明の二重特異的抗原結合性分子を用いて阻害または死滅させ得る CD20 発現細胞には、例えば、腫瘍原性 B 細胞が含まれる。

40

【0226】

腫瘍量の減少または腫瘍退縮には、被験者における腫瘍（複数可）の部分的または完全な消失が含まれる。腫瘍退縮は、より低い腫瘍負荷またはより低い疾患重症度への傾向を表すことが理解される。このように、縮退は腫瘍サイズ及び / または腫瘍数の減少を含む、体内の測定可能な悪性腫瘍の進行性の低下または除去である。腫瘍発生の減少には、更なるまたは新たな腫瘍増殖の、部分的もしくは完全な阻害もしくは抑制が含まれる。

【0227】

本発明の抗原結合性分子は、脳及び髄膜、中咽頭、肺及び気管支、消化管、男性及び女性の生殖器官、筋肉、骨、皮膚及び付属器、結合組織、脾臓、免疫系、血液形成細胞及び

50

骨髓、肝臓、尿路、及び眼のような特殊な感覚器官に発生する、例えば原発性及び／または転移性の腫瘍をターゲティング及び治療するために使用することができる。一定の実施形態において、本発明の二重特異的抗原結合性分子性は、以下の癌の1以上を治療するために使用される：即ち、腎細胞癌、膵臓癌、乳癌、頭頸部癌、前立腺癌、悪性神経膠腫、骨肉腫、結腸直腸癌、胃癌（例えば、MET増幅を伴う胃癌）、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、滑膜肉腫、甲状腺癌、またはメラノーマである。一定の例示的实施形態によれば、本発明の二重特異的抗原結合性分子は、B細胞癌（例えば、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫[NHL]）、前駆B細胞リンパ芽球性白血病／リンパ腫、成熟B細胞新生物を治療するために使用されます、B細胞慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ性リンパ腫、マン

10

20

30

40

50

【0228】

本発明の抗CD3／抗CD20二重特異的抗原結合性分子は、腫瘍負荷を低減し、腫瘍退縮を生じさせ、腫瘍増殖を阻害し、または被験者における腫瘍の発生を減少させるために十分な量で投与される。本発明の幾つかの例示的实施形態において、前記投与量は、約0.001mg/kg～約1mg/kgである。他の実施形態において、前記投与量は、約0.4mg/kgです。他の実施形態では、前記投与量は、約0.04mg/kgである。更に他の実施形態では、前記投与量は約0.004mg/kgである。

【0229】

本発明の一定の実施形態によれば、前記抗原結合性分子は、抗CD20療法単独に対して耐性（例えばアリツキシマブ療法に対して耐性）であるか、または不完全に反応するB細胞リンパ腫（例えば、NHL）に罹患した患者を治療するために有用である。本発明の関連する他の実施形態によれば、抗CD20療法に対して耐性であるB細胞リンパ腫（例えば、NHL）に罹患した患者（例えば、リツキシマブ耐性腫瘍、または再発性または耐性B細胞リンパ腫を有する患者）に対して、本明細書に開示された抗CD3／抗CD20二重特異的抗原結合性分子を投与することを含む方法が提供される。腫瘍スクランニング等のような当技術分野で既知の解析／診断方法は、抗CD20療法単独に対して不完全に

【0230】

本発明はまた、被験者における残留癌を治療するための方法を包含する。本明細書で使用する「残留癌」の用語は、抗癌療法で治療した後の被験者において、1以上の癌性細胞が存在または持続することを意味する。

【0231】

一定の態様によれば、本発明は、CD20の発現に関連する疾患または障害（例えば、B細胞リンパ腫）を治療するための方法であって、被験者が抗CD20単独療法を受けた後に（例えば、リツキシマブなどの抗CD20抗体を含入する医薬組成物を投与した後に）、本明細書の他の箇所で記載した1以上の二重特異的抗原結合性分子を投与することを含む方法を提供する。例えば、本発明は、B細胞リンパ腫を治療するための方法であって、前記被験者が抗CD20単独療法（例えば、リツキシマブ治療またはその等価物の治療）を受けてから1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間もしくは4週間、2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、8ヶ月、1年、またはそれ以上後に、抗CD3／抗CD20二重特異的抗原結合性分子を投与することを含む方法を包含する。

【0232】

<併用療法及び製剤>

本発明は、本明細書の何処かに記載した例示的抗体及び二重特異的抗原結合性分子の何れかを含有する医薬組成物を、1以上の追加の治療剤と組み合わせて投与することを含む

方法を提供する。本発明の抗原結合性分子と組み合わせて投与することができる典型的な追加の治療剤には、例えば、EGFRの拮抗剤（例えば抗EGFR抗体〔例えば、セツキシマブまたはパニツムマブ〕またはEGFRの小分子阻害剤〔例えば、ゲフィチニブまたはエルロチニブ〕）、Her2/ErbbB2、ErbbB3もしくはErbbB4のような別のEGFRファミリーメンバーの拮抗剤（例えば、抗ErbbB2、抗ErbbB3もしくは抗ErbbB4の抗体、またはErbbB2、ErbbB3、もしくはErbbB4活性の小分子阻害剤）、EGFRvIIIの拮抗剤（例えば、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体）、cMET拮抗剤（例えば、抗cMET抗体）、IGF1R拮抗剤（例えば、抗IGF1R抗体）、B-r af阻害剤（例えば、ベムラフェニブ、ソラフェニブ、GDC-0879、PLX-4720）、PDGFR- α 阻害剤（例えば、抗PDGFR- α 抗体）、PDGFR- β 阻害剤（例えば、抗PDGFR- β 抗体）、VEGF拮抗剤（例えば、VEGF-Trap、例えば、US7,087,411参照〔本明細書では「VEGF阻害融合タンパク質」とも言う〕、抗VEGF抗体〔例えば、ベバシズマブ〕、VEGF受容体の小分子キナーゼ阻害剤〔例えば、スニチニブ、ソラフェニブまたはパゾパニブ〕）、DLL4拮抗剤（例えばUS2009/0142354に開示されている抗DLL4抗体）、Ang2拮抗剤（例えば、H1H685PのようなUS2011/0027286に記載された抗Ang2に抗体）、FOLH1拮抗剤（例えば、抗FOLH1抗体）、PRLR拮抗剤（例えば、抗PRLR抗体）、STEAP1またはSTEAP2拮抗剤（例えば、抗STEAP1抗体または抗STEAP2抗体）、TMPRSS2拮抗剤（例えば、抗TMPRSS2抗体）、MSLN拮抗剤（例えば、抗MSLN抗体）、CA9拮抗剤（例えば、抗CA9抗体）、ウロプラキン拮抗剤（例えば、抗ウロプラキン抗体）、抗CTLA4抗体（例えばイピリムマブ（MDX-010））、一価CD20拮抗剤（例えば、リツキシマブのような一価の抗CD20抗体）等が含まれる。

【0233】

本発明の抗原結合性分子と組み合わせて有益に投与できる他の薬剤には、免疫活性化剤または阻害剤が含まれる。一定の免疫活性化剤または阻害剤は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18等のサイトカイン、またはそれらの各受容体に結合する小分子化合物及び抗体を含む、サイトカイン活性化剤または阻害剤である。本発明の医薬組成物（例えば、本明細書に開示される抗CD3/抗CD20二重特異的抗原結合性分子を含む医薬組成物）はまた、次の「ICE」から選択される1つ以上の治療的組み合わせを含む最適治療計画の一部として投与できる：即ち、イホスファミド（例えば、Ifex（登録商標））、カルボプラチン（例えば、パラプラチン）、エトポシド（例えば、Etopophos（登録商標）、Toposar（登録商標）、VePesid（登録商標）、VP-16）；「DHAP」：デキサメタゾン（例えば、Decadron（登録商標））、シタラビン（例えば、Cytosar-U（登録商標））、シトシンアラビノシド、ARA-C）、シスプラチン（例えば、プラチノール-AQ）；及び「ESHAP」：エトポシド（例えば、Etopophos（登録商標）、Toposar（登録商標）、VePESID（商標）、VP-16）、メチルプレドニゾロン〔例えば、Medrol（登録商標）〕、高用量シタラビン、シスプラチン（例えば、プラチノール-AQである）。

【0234】

本発明はまた、本明細書に記載の抗原結合性分子の何れかと、VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbbB2の、ErbbB3の、ErbbB4の、EGFRvIII、cMet、IGF1R、B-r af、PDGFR- α 、PDGFR- β 、FOLH1、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、ウロプラキン、または上記サイトカインの何れかのうちの1以上の阻害剤を含む治療的組み合わせを包含するものであり、ここでの前記阻害剤は、アブタマー、アンチセンス分子、リボザイム、siRNA、ペプチボディ、ナノボディまたは抗体断片（例えば、Fab断片、F(ab')₂断片、Fd断片、Fv断片、scFv、dAb断片；またはダイアボディ、ト

リアボディ、テトラボディ、ミニボディ及び最小認識単位等の他の操作された分子)である。本発明の抗原結合性分子はまた、抗ウイルス剤、抗生物質、鎮痛剤、コルチコステロイド及び/またはNSAID類との組み合わせにおいて投与及び/または同時処方することができる。本発明の抗原結合性分子はまた、放射線治療及び/または従来の化学療法を含む最適治療計画の一部として投与することができる。

【0235】

追加の治療的活性成分(複数可)は、本発明の抗原結合性分子の投与の直前に、該投与と同時に、または該投与の暫く後に投与されてよい(本開示の目的のために、そのような投与計画は、追加の治療的活性成分「との組み合わせで」抗原結合性分子の投与が考慮される)。

10

【0236】

本発明は、本明細書の他の箇所で説明したように、本発明の抗原結合性分子が1以上の追加の治療的活性成分と同時に製剤化される医薬組成物を包含する。

【0237】

<投与計画>

本発明の一定の実施形態によれば、抗原結合性分子(例えば、抗CD3抗体、またはCD20及びCD3に特異的に結合する二重特異的抗原結合性分子)の複数回投与は、定義された時間コースに亘って被験者に投与することができる。本発明のこの態様による方法は、本発明の抗原結合性分子の複数回用量を、被験者に経時的に投与することを含んでいる。ここで用いるとき、「経時的に投与する」とは、抗原結合性分子の各用量が、異なる時点において、例えば予め定められた間隔(例えば時間、日数、週数または月数)で隔てられた異なる日に、前記被験者に投与されることを意味する。本発明は、前記患者に対して、抗原結合性分子の単回の初期用量と、続いて前記抗原結合性分子の1回以上の二次用量と、続いて任意に、抗原結合性分子の1回以上の三次用量を順次患者に投与することを含む方法を包含する。

20

【0238】

「初期用量」、「二次用量」及び「三次用量」の用語は、本発明の抗原結合性分子の時系列的投与を言う。従って、「初期用量」は、治療計画の開始時に投与される用量であり(以下、「ベースライン用量」という);「二次用量」は、初期用量の後に投与される用量であり;「三次用量」は、前記二次用量の後に投与される用量である。初期、二次、及び三次用量は全て、同じ量の抗原結合性分子を含有してもよいが、一般には、投与頻度の点で相互に異なっている。しかし、一定の実施形態において、初期、二次及び/または三次用量に含まれる抗原結合性分子の量は、治療コースの際に相互に変化する(例えば、適宜上方または下方調節される)。一定の実施形態において、2以上(例えば、2、3、4、または5)の用量が、「負荷用量」として治療計画の開始時に投与されより、続いて、より少ない頻度ベースで投与されるその後の用量(例えば「維持用量」)が投与される。

30

【0239】

本発明の典型的な一実施形態において、それぞれの二次及び/または三次用量は、直前の用量の1~26週後(例えば、1、 $1^{1/2}$ 、2、 $2^{1/2}$ 、3、 $3^{1/2}$ 、4、 $4^{1/2}$ 、5、 $5^{1/2}$ 、6、 $6^{1/2}$ 、7、 $7^{1/2}$ 、8、 $8^{1/2}$ 、9、 $9^{1/2}$ 、10、 $10^{1/2}$ 、11、 $11^{1/2}$ 、12、 $12^{1/2}$ 、13、 $13^{1/2}$ 、14、 $14^{1/2}$ 、15、 $15^{1/2}$ 、16、 $16^{1/2}$ 、17、 $17^{1/2}$ 、18、 $18^{1/2}$ 、19、 $19^{1/2}$ 、20、 $20^{1/2}$ 、21、 $21^{1/2}$ 、22、 $22^{1/2}$ 、23、 $23^{1/2}$ 、24、 $24^{1/2}$ 、25、 $25^{1/2}$ 、26、 $26^{1/2}$ 、またはそれ以上後)に投与される。ここで用いるとき、本明細書で使用される「直前の用量」の語句は、経時的な複数回投与において、介在する用量を伴わない時系列において、その直後の用量の直前に投与される抗原結合性分子の用量を意味する。

40

【0240】

本発明のこの態様に従う方法は、患者への抗原結合性分子(例えば、CD20及びCD3に特異的に結合する二重特異的抗原結合性分子)の任意の回数の二次及び/または三次

50

用量を投与することを含むことができる。例えば、一定の実施形態では、単回の二次用量が患者に投与されます。他の実施形態では、2回以上の（例えば、2、3、4、5、6、7、8回、またはそれ以上）の二次用量が患者に投与される。同様に、一定の実施形態では、単回の三次用量が患者に投与される。他の実施形態では、2回以上の（例えば、2、3、4、5、6、7、8回、またはそれ以上）の三次用量が患者に投与される。

【0241】

複数の二次用量を含む実施形態において、各二次用量は、他の二次用量と同じ頻度で投与されてよい。例えば、各二次用量は、直前の用量の1～2週間後に患者に投与することができる。同様に、複数の三次用量を含む実施形態において、各三次用量は、他の三次用量と同じ頻度で投与してもよい。例えば、各々の三次用量は、直前の用量の2～4週間後に患者に投与することができる。或いは、二次及び/または三次の用量が患者に投与される頻度は、治療計画の過程において変化することができる。投与の頻度はまた、臨床検査に従い、個々の患者の必要性に応じて臨床医が治療の経過中に調製することができる。

10

【0242】

< 抗体の診断的使用 >

本発明の抗CD3×CD20抗体はまた、例えば診断目的のために、サンプル中のCD3またはCD3発現細胞を検出及び/または測定するために使用できる。例えば、抗CD3×CD20抗体、またはその断片は、CD3の異常な発現（例えば、過剰発現、過少発現、発現の欠如等）を特徴とする状態または疾患を診断するために使用することができる。CD3についての例示的な診断アッセイは、例えば、患者から得られた試料を本発明の抗CD3×CD20抗体と接触させることを含むことができ、ここでの前記抗体は検出可能な標識またはレポーター分子で標識される。或いは、非標識の抗CD3×CD20抗体は、それ自身が検出可能に標識された二次抗体と組み合わせ、診断用途で使用することができる。検出可能な標識またはレポーター分子は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、または¹²⁵Iのような放射性同位体；フルオレセインイソチオシアネート、またはローダミンのような蛍光性もしくは化学発光性部分；または、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、もしくはルシフェラーゼのような酵素であることができる。試料中のCD3を検出または測定するために用い得る特定の例示的なアッセイには、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、及び蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）が含まれる。

20

30

【0243】

本発明の抗CD3×CD20抗体はまた、サンプル中のCD20、またはCD20発現細胞を検出及び/または測定するために、或いはCD20の異常発現（例えば過剰発現、過少発現、発現欠如等）を特徴とする状態または疾患を診断するために使用することができる。

【0244】

本発明に従うCD3及び/またはCD20診断アッセイにおいて使用できるサンプルには、正常なまたは病理学的状態の下で患者から入手可能な、検出可能な量のCD3及び/またはCD20タンパク質、またはその断片を含有する任意の組織もしくは体液サンプルが含まれる。一般的に、健康な患者（例えば、CD3またはCD20の異常なレベルまたは活性に関連する疾患または状態に罹患していない患者）から得られた特定のサンプル中のCD3またはCD20のレベルは、CD3またはCD20のベースライン、または標準のレベルを最初に確立するために測定されるであろう。このCD3またはCD20のベースラインレベルは、その後、それぞれCD3またはCD20に関連する疾患または状態を有することが疑われる個体から得た試料中で測定されたCD3のレベルと比較することができる。

40

【実施例】

【0245】

以下の実施例は、当業者に対して、本発明の方法及び組成物を作成する方法及び使用する方法の完全な開示及び説明を提供するために記載されるものであり、発明者等が彼等の

50

発明であると看做す範囲の限定を意図するものではない。使用する数（例えば量、温度など）に関して正確さを確保するための努力がなされてきたが、幾つかの実験的誤差及び偏差は考慮されるべきである。特に断らない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏の度数であり、圧力は大気圧または大気圧近傍におけるものである。

【0246】

実施例1：抗CD3及び抗CD20抗体の生成

抗CD3または抗CD20抗体を単離するための幾つかの方法が知られている。US2007/0280945A1に記載されているように、以下の実施例で使用される完全ヒト抗CD3抗体は、骨髓腫細胞に融合させることなく、抗原陽性B細胞から直接単離された。

10

【0247】

抗CD3抗体の更なる例は、前記方法で用いることができ、そのような抗体及び抗CD3抗体の生物学的特性の記述は、2013年9月19日出願のPCT国際出願番号PCT/US13/60511に記載されており、その全体を本明細書の一部として援用する。例示的な抗CD20抗体及びかかる抗CD20抗体の生物学的特性は、US7,879,984及び2013年9月19日に出版されたPCT国際出願番号PCT/US13/60511に記載されており、その各々を本明細書の一部として援用する。

【0248】

この実施例の二重特異的抗体を構築するために使用される抗CD20抗体、及びこの実施例の抗体を構築するために使用される抗CD20抗体及びその抗体の作成方法は、US7,879,984に記載される通りである。

20

【0249】

本発明の二重特異的抗体の抗CD3抗原結合性アーム及び抗CD20結合性アームを構成するために使用される、重鎖及び軽鎖の可変領域及びCDRのアミノ酸配列識別子が表1に記載されている。対応する核酸配列識別子が表2に記載されている。

【0250】

【表7】

表1：アミノ酸配列識別子（配列番号）

抗体の 名称	配列番号：							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
抗-CD20	2	4	6	8	18	20	22	24
抗-CD3	10	12	14	16	18	20	22	24

30

表2：核酸配列識別子（配列番号）

抗体の 名称	配列番号：							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
抗-CD20	1	3	5	7	17	19	21	23
抗-CD3	9	11	13	15	17	19	21	23

40

【0251】

実施例2：CD3及びCD20に結合する二重特異的抗体の生成

抗CD3特異的結合性ドメイン及び抗CD20特異的結合性ドメインを具備する二重特異的抗体が、前記標準的な方法論を使用して上記の配列を用いて構築され、ここでは抗CD3抗体由来の重鎖及び同族の軽鎖が、抗CD20抗体由来の重鎖と組み合わせられた。

【0252】

このように、本実施例に従って作成された二重特異的抗体は、2つの別々の抗原結合性ドメイン（すなわち、結合性アーム）を含む。第一の抗原結合性ドメインは、抗CD3抗

50

体（「CD3-VL」）に由来する軽鎖可変領域とペアになった、抗CD20抗体（「CD20-VH」）に由来する重鎖可変領域を具備する。CD20-VH/CD3-VLの対合によって、CD20を特異的に認識する抗原結合性ドメインが作製される。第二の抗原結合性ドメインは、抗CD3抗体に由来する軽鎖可変領域（「CD3-VL」）とペアになった抗CD3抗体に由来する重鎖可変領域（「CD3-VH」）を具備する。CD3-VH/CD3-VL対合により、CD3を特異的に認識する抗原結合性ドメインが作製される。同じCD20-VHは、この実施例において作製された全ての二重特異的抗体に使用され、「CD20-VH-A」と称される。

【0253】

各重鎖のための野生型重鎖定常ドメイン（CH）は、組換え技術によって、キメラCHで置換された。一つの結合性アーム（例えば、抗CD3結合性アーム）のCHには、CHのCH3領域における変異が含まれており、これは二重特異性の単離を容易にする。

【0254】

本実施例に従って製造された種々の二重特異的抗体のパーツの概要を、表3及び表4に記載する。

【0255】

【表8】

表3：アミノ酸配列識別子

二重特異性 抗体名称	抗CD20抗原結合性ドメイン			抗CD3抗原結合性ドメイン		
	重鎖 可変 領域	重鎖 定常 領域	軽鎖 可変 領域	重鎖 可変 領域	重鎖 定常 領域	軽鎖 可変 領域
	CD20-VH-A	CH	CD3-VL-A	CD3-VH-A	CH	CD3-VL-A
抗体1	2	26	18	10	28	18
抗体2	2	30	18	10	32	18

表4：核酸配列識別子

二重特異性 抗体名称	抗CD20抗原結合性ドメイン			抗CD3抗原結合性ドメイン		
	重鎖 可変 領域	重鎖 定常 領域	軽鎖 可変 領域	重鎖 可変 領域	重鎖 定常 領域	軽鎖 可変 領域
	CD20-VH-A	CH	CD3-VL-A	CD3-VH-A	CH	CD3-VL-A
抗体1	1	25	17	9	27	17
抗体2	1	29	17	9	31	17

【0256】

表5及び表6は、本実施例の二重特異的抗体の種々の重鎖可変領域（表5）及び軽鎖可変領域（表6）のアミノ酸配列識別子を、それらの対応するCDRと共に提示している。

【0257】

【表 9】

表 5 : 重鎖アミノ酸配列識別子

重鎖 識別子	重鎖 可変領域 (HCV R)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	重鎖 定常 領域 (CH)
CD20-VH-CH-A	2	4	6	8	26または 28または 30または 32
CD3-VH-CH-A	10	12	14	16	

10

表 6 : 軽鎖アミノ酸配列識別子

軽鎖 識別子	軽鎖 可変領域 (LCV R)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-A	18	20	22	24

20

【0258】

加えて、表 7 及び 8 は、この実施例の二重特異的抗体の種々の重鎖可変領域（表 7）、重鎖定常領域、及び軽鎖可変領域（表 8）をコードするヌクレオチド配列についての配列識別子を、それらの対応する C D R と共に提示している。

30

【0259】

【表 10】

表 7：重鎖核酸配列識別子

重鎖識別子	重鎖 可変領域 (HCV R)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	重鎖 定常 領域 (HCV R)
CD20-VH-A	1	3	5	7	25 または 27 または 29 または 31
CD3-VH-A	9	11	13	15	

10

表 8：軽鎖核酸配列識別子

軽鎖識別子	軽鎖可変領域 (LCV R)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-A	17	19	21	23

20

【0260】

上記の二重特異的抗体に加えて、以下のような対照抗体もまた、この実施例に提示され一定の実験において使用した：

30

【0261】

対照抗体 1：US 4,361,549 に記載され、且つハイブリドーマ CRL-8001（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、VA）から入手可能な、ヒト T 細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体「OKT-3」。

【0262】

対照抗体 2：BD ファルマジェン社、カタログ # 55052 から入手可能なヒト T リンパ球細胞上の T3 複合体イプシロン鎖に対して反応性の抗体「SP34」。

【0263】

対照抗体 3：US 5,736,137 に開示されたリツキサン（登録商標）（リツキシマブ）の重鎖及び軽鎖配列を有する抗 CD20 治療用抗体。

40

【0264】

対照抗体 4：CD3×CD20 抗体 - 野生型 Fc (wt Fc) としても知られる。この抗体は、配列番号 2/18 の HCV R / LCV R アミノ酸配列対（HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3：配列番号 4 - 6 - 8 - 20 - 22 - 24 のアミノ酸配列）、及び野生型 IgG1・CH 領域（配列番号 45）を備えた抗 CD20 アームと；配列番号 10/18 の HCV R / LCV R アミノ酸配列対（配列番号 12 - 14 - 16 - 20 - 22 - 24 の HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3 アミノ酸配列）、及び単離を容易にするために CH3 ドメインに 2 つのアミノ酸修飾を含む野生型 IgG1・CH 領域（配列番号 48）を具備する抗 CD3 アームを有するように、上記方法と同様に作成された。CD3×CD20 抗体—w

50

t F c (抗体 4) は、異なる F c ドメイン配列または構造を有する抗体に対して抗体エフェクター機能または他の特性を比較する目的で、野生型 I g G 1・F c ドメインを有する適合性対照抗体 (即ち、本発明の C D 3 × C D 2 0 キメラ F c 抗体の抗原結合性ドメインに適合された) と呼ぶことができる。

【 0 2 6 5 】

対照抗体 5 : 抗 F e l D 1 モノクローナル抗体は、ヒト C D 2 0 または C D 3 に対する交差反応性を伴わずにネコ抗原に結合する。この I g G 1 非特異的抗体対照は、2013 年 1 1 月 7 日に公開された P C T 公開番号 W O 2 0 1 3 / 1 6 6 2 3 6 に記載された方法によって得た。

【 0 2 6 6 】

対照抗体 6 : 本明細書に記載の抗 F e l D 1 抗原結合ドメインが、P C T 公開番号 W O 2 0 1 3 / 1 6 6 2 3 6 に記載されているように、A b 1 と同様に、キメラ I g G 4・F c ドメインを含むように操作された。対照 A b 6 は、ヒト C D 2 0 または C D 3 に対する交差反応性を有していないが、A b 1 と同様のエフェクター機能を有する。

【 0 2 6 7 】

実施例 3 : キメラ重鎖の構築

キメラ重鎖、例えばキメラ C H・I g G 4 (配列番号 2 6) 及びキメラ C H・I g G 1 (配列番号 3 0) の生成は、標準的なクローニング技術を用いて行った。まず、キメラ I g G 4・C H は 2 段階 P C R 増幅法を介して生成された。2 つの P C R 断片、即ち、断片 1 及び 2 は、それぞれ C H 領域に隣接するプライマー対である P 1 - P 2 及び P 3 - P 4 を用いて、野生型 h I g G 4 C H・D N A を含む出発ベクター構築物 p R 0 0 1 を用いて増幅させた。下記の表 9 を参照されたい。これらのプライマーは、望ましい I g G 2 の下側ヒンジ配列 (これは配列番号 5 2 をコードする)、及び隣接する制限部位を前記断片の中に導入した。次いで、これら二つの断片は、P C R プライマー P 2 及び P 4 を用いて連結された。得られた配列を X h o 1 - N o t 1 制限部位を介して p R 0 0 1 の中に挿入して、I g G 2 下側ヒンジ配列を有するキメラ I g G 4・C H を含んだベクター構築物 p R 0 0 2 生成した。配列は、プライマー P 1 0 及び P 1 1 を用いて確認した。

【 0 2 6 8 】

加えて、キメラ I g G 1・C H が、複数ステップの P C R 増幅によって生成された。断片 1 a は、テンプレート p R 8 5 5 0 3 (これは野生型ヒト I g G 1 C H・D N A を含む) から、プライマー P 2 及び P 5 (下記の表 9 を参照されたい) を使用して生成させた。断片 2 a を、テンプレートとして p R 0 0 2 (キメラ I g G 4 C H・D N A を含む) を使用し、プライマー P 6 及び P 8 を用いて増幅した。断片 3 は、テンプレート p R 0 0 3 (野生型 h I g G 1 C H・D N A ; 配列番号 4 5) から、プライマー P 7 及び P 9 を用いて作製された。断片 1 a 及び 2 a を、プライマー P 2 及び P 8 を用いて融合させ、これにより断片 4 が生じた。プライマー P 6 及び P 9 を使用して断片 2 a 及び 3 を連結することにより、断片 5 を作製した。次いで、プライマー P 2 及び P 9 を使用して断片 4 及び 5 を融合させた。この得られた配列を、X h o 1 - N o t 1 制限部位を介して p R 0 0 1 の中に挿入し、I g G 2 下側ヒンジ及び I g G 4・C H 2 ドメインと共に I g G 1 定常領域を有する構築物 p R 0 0 4 を生じさせた。該配列は、プライマー P 1 0 及び P 1 1 を用いて確認された。

【 0 2 6 9 】

10

20

30

40

【表 1 1】

表 9 : キメラ C_H 核酸構築物の P C R 生成のためのプライマー

プライマー名称	プライマー配列 (配列番号)
P1	5'-TTCGCGCAGCTTAGGTTTATGCCAGGGGGGACGGGTGGCACGGGTCGTGGTGGACACCGT-3' (アンチセンス) (配列番号 6 3)
P2	5'-AAGCTTATACTCGAGCTCTAGATTGGGAACCCGGGTCTCT-3' (配列番号 6 4)
P3	5'-CCCACCGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAA-3' (配列番号 6 5)
P4	5'-TGTGTCTTCAGGGAGAGGGACAGAGACCCATTTACTCGCC GGCG-3' (アンチセンス) (配列番号 6 6)
P5	5'-CTCGGGTTTAGAAGACTGTTTTGAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCGTGGTGGACACCGT-3' (アンチセンス) (配列番号: 6 7)
P6	5'-AAATCTTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCACTGTG-3' (配列番号 6 8)
P7	5'-GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC-3' (配列番号: 6 9)
P8	5'-CTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTTCCCGTCGGGGCTCTTG GTGTCCACATGTGG-3' (アンチセンス) (配列番号 7 0)
P9	5'-CTTCAGGGAGAGGGACAGAGGCCCATTTACTCGCCGGCG-3' (アンチセンス) (配列番号 7 1)
P10	5'-GCTGACAGACTAACAGACTG-3' (配列番号 7 2)
P11	5'-ATACATTATACGAAGTTATACCGGTA-3' (配列番号 7 3)

10

20

【 0 2 7 0 】

実施例 4 : 単一特異性の対照抗体と比較して、C D 2 0 × C D 3 二重特異的抗体は J u r k a t 細胞、R a j i 細胞及びサル T 細胞に選択的に結合する

J u r k a t 細胞 (C D 3 + 、 C D 2 0 - ヒト T 細胞株) 、 R a j i 細胞 (C D 3 - 、 C D 2 0 + ヒト B 細胞株) 、またはカニクイザルの P B M C (「 m k T 細胞」) に対する結合能力についての F A C S 結合法を介して、C D 3 × C D 2 0 抗体 w t F c (対照抗体 4) を、実施例 2 に記載した単一特異性の対照抗体と比較した。

【 0 2 7 1 】

F A C S データは、以下のプロトコルを用いて取得された：ウエル当たり 2×10^5 細胞を氷上で 3 0 分間、連続希釈した抗体と共にインキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、適切な二次 (ジャーカット細胞、R A J I 細胞) または二次抗体カクテル (カニクイザル P B M C 用) を添加し、更に 3 0 分間インキュベートした。インキュベーション後、1 % B S A を含有する冷 P B S 中に細胞を再懸濁し、B D ・ F A C S カント I I フローサイトメトリーにより分析し再洗浄した。ジャーカット細胞及び R a j i 細胞を側方及び前方散乱によりゲートされる一方、カニクイザルの T 細胞もまた、C D 2 + C D 4 + の集団としてゲートされた。細胞結合滴定のための E C ₅₀ を、4 パラメータの非線形回帰分析を用いて計算された値を使用して、P r i s m ソフトウェアを用いて決定した。結果を表 1 0 に示す。

30

【 0 2 7 2 】

40

【表 1 2】

表 1 0 : 単一結合性抗体 v s . C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体についての
E C 5 0 結合値 (モル)

抗体	FACS-ジャーカット	FACS - RAJI	FACS - m k T細胞
対照 1 (抗 C D 3)	1.96E-10	NB	NB
対照 2 (抗 C D 3)	(+)	NB	7.03E-11
対照 3 (抗 C D 2 0)	結合なし	(+)	NB
対照 4	3.85E-08	5.99E-08	8.74E-06
(抗 C D 3 × C D 2 0 , 野生型 C H)			

10

(+) E C ₅₀ 値は測定されなかったが、結合は観察された；NB 結合なし；
NT 試験せず

【 0 2 7 3 】

表 1 0 に示すように、試験した抗体のパネルは、それらの特異性に依存して、種々の細胞株へのある範囲の結合親和性を示した。二重特異性対照抗体 4 は、ヒト及びカニクイザル標的細胞株の両方に結合する能力を示した。対照抗体 4 は、抗体 1 及び本発明の抗体 2 と同じ抗 C D 3 × C D 2 0 可変領域を含む、野生型 I g G 1 ・ C H 領域を有している。抗 C D 3 対照 1 (O K T 3)、抗 C D 3 対照 2 (S P 3 4)、及び抗 C D 2 0 対照 3 は、ジャ

20

【 0 2 7 4 】

実施例 5 : 野生型 C H を備えた C D 2 0 × C D 3 二重特異的抗体は、活性化 T 細胞の存在下で、R a j i 細胞に対する細胞傷害性を誘導する

C D 2 0 を発現する R a j i 細胞に対して T 細胞媒介性殺滅をリダイレクトさせる C D 2 0 × C D 3 二重特異的抗体の能力を、インビトロ細胞傷害アッセイで試験した。加えて、F c / の F c R 相互作用を介して U 9 3 7 細胞を死滅させる、二重特異的抗体の及び親抗 C D 3 抗体の両方の能力についても研究した。

【 0 2 7 5 】

カルセイン殺傷アッセイを、以下のプロトコルを用いて行った：ヒト及びカニクイザル P B M C をそれぞれ、フィコール・ブランク上で、またはリンホライト (L y m p h o l y t e) 哺乳類細胞分離媒体を介して単離した。この単離された P B M C を、組換えヒト I L - 2 (3 0 U / m L) 及び T 細胞活性化ビーズ (ヒト P B M C のための抗 C D 3 / C D 2 8 、カニクイザル P B M C のための抗 C D 2 / C D 3 / C D 2 8) を含有する培地を用いて、数日間のコースに亘って活性化させた。

30

【 0 2 7 6 】

標的細胞 (C D 2 0 媒介性死滅のための R a j i 及び F c R を媒介性死滅のための U 9 3 7) をカルセインで標識し、3 倍血清希釈の抗体を用い、1 0 : 1 のエフェクター：ターゲット比において活性化 T 細胞と共に、3 7 で 3 時間のコースに亘ってインキュベートした。インキュベーション後、プレートを遠心分離し、その上清を蛍光分析のための半透明黒色透明底プレートに移した。5 0 % の細胞傷害性を誘導する二重特異的抗体のモル濃度として定義される E C ₅₀ を、プリズムを用いて測定した。数値は、4 パラメータ非線形回帰分析を用いて計算された。結果を表 1 0 に要約する。

40

【 0 2 7 7 】

【表 1 3】

表 1 1 : R a j i 細胞及びU 9 3 7細胞に対してC D 2 0 × C D 3により誘導された細胞傷害についてのE C ₅₀ 値

抗体	R a j i 細胞傷害性 ヒトT細胞 [M]	R a j i細胞傷害性 サルT細胞 [M]	U 9 3 7細胞傷害性 ヒトT細胞 [M]
対照A b 1 (抗C D 3)	NA	NA	3.04E-12
対照A b 4 (抗C D 3 × C D 2 0)	5.63E-11*	1.27E-12*	8.86E-11*

(*) データは3以上の独立したアッセイの中央値である。 (*) 無し
のデータは、1または2の独立したアッセイの代表的／平均の値である。 N A =
活性なし。

10

【0 2 7 8】

表 1 1 に示すように、ヒト特異的でカニクイザル交差反応性の抗 C D 3 アーム、及び野生型 I g G 1 ・ C H 領域を含む二重特異性 C D 2 0 × C D 3 抗体は、ヒト活性化 T 細胞の存在下で、細胞傷害性を R a j i 細胞に特異的にリダイレクトさせることができた。カニクイザル活性化 T 細胞の存在下において、R a j i は、それらがサル T 細胞を活性化させる抗 C D 3 アームを有する対照 A b 4 二重特異的抗体と共にインキュベートされたときに殺滅された。前記二重特異的抗体並びに対照 A b 1 (抗 C D 3 m A b) の両者が、U 9 3 7 F c / F c R 依存性殺滅アッセイにおける活性を示した。この活性は、非特異的ヒト I g G のブロッキングを反応に加えることによって阻止された (データは示さず) 。

20

【0 2 7 9】

実施例 6 : C D 2 0 × C D 3 二重特異的抗体を含むキメラ C H 領域は、C D C アッセイにおいて低下したエフェクター機能を示す

キメラ C H 領域を有する C D 2 0 × C D 3 二重特異的抗体 (抗体 1 、 抗体 2) は、上記の実施例 2 で述べたように、エフェクター機能を変化させ、または減少させるように操作された。I g G 1 アイソタイプ (対照 A b 4) の野生型 (W T) 重鎖定常領域を備えた抗体と比較して、C H 領域におけるアミノ酸置換は、I g F c がその受容体 (複数可) に結合する能力を妨げることができる。従って、B 細胞の活性化または食作用のような、シグナル伝達及び免疫応答は変更され得る。補体依存性細胞傷害性 (C D C) (この実施例で) 及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) エフェクター機能 (実施例 7 参照) に対する、C H 領域でのアミノ酸置換の影響が試験された。

30

【0 2 8 0】

C D C エフェクター機能に抗体 1 及び抗体 2 の効果を調べるために、C D 2 0 を発現する R a j i (標的) 細胞 (5 0 0 0 / ウェル) または D a u d i 細胞を、5 % ヒト血清補体の存在下で播種した。1 0 0 n M で開始して、抗体 1 、抗体 2 及び対照抗体の連続希釈液を、3 7 ° C で 4 時間、細胞に添加した。標的細胞の溶解は、C y t o T o x グロ (商標) キット (P r o m e g a) を用いて測定し、パーセント細胞傷害性を算出した。

40

【0 2 8 1】

パーセント細胞傷害性は、以下の式を用いて計算した :

$$\% \text{細胞傷害性} = ((L_{S-R} - L_{S-R}) / (L_{M-R} - L_{S-R})) \times 100 \%$$

ここでの L_{S-R} は、ベースライン標的細胞発光であり、 L_{M-R} は、ジギトニンに溶解された細胞からの最大カルセイン放出である。細胞傷害性についての E C ₅₀ は、プリズムソフトウェア (G r a p h P a d) を使用して決定した。数値は 4 パラメータ非線形回帰分析を用いて計算したものであり、これを表 1 2 、図 5 A 及び図 5 B に示す。

【0 2 8 2】

抗体 1 及び抗体 2 の D a u d i 細胞及び R a j i 細胞に対する C D C 活性は、w t 重鎖定常領域を持った対応の抗体に比較して有意に低下する。表 1 2 、及び図 5 A / B を参照

50

されたい。R a j i 細胞に対する抗体 1 で幾らかの C D C 活性が観察されたが、全体的な結果は、キメラ抗体が野生型 I g G 1 ・ F c 対照抗体よりも弱いエフェクター応答をマウントすることを示している。

【 0 2 8 3 】

【表 1 4】

表 1 2 : キメラ C H 領域を含む C D 2 0 × C D 3 二重特異的抗体は、エフェクター機能を測定する C D C アッセイにおいて低下した活性を示す

CDC				
標的細胞→	Daudi		Raji	
	EC ₅₀ [M]	最大細胞 傷害性 (%)	EC ₅₀ [M]	最大細胞 傷害性 (%)
対照 A b 4	6.12E-08	~95	1.98E-08	~85
Ab 1	NA	NA	2.86E-08	~45
Ab 2	NA	NA	3.49E-08	~10

NA : 活性なし

10

20

【 0 2 8 4 】

実施例 7 : キメラ C H 領域を含む C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体は、A D C C アッセイにおいて低下したエフェクター機能を示す

A D C C エフェクター機能に対する抗体 1 及び抗体 2 v s . 野生型 C H 領域 (及び同一の可変領域) を備えた二重特異的抗体の効果を調べるために、F c γ R I I I A のより高い親和性 V 対立遺伝子を発現するように操作された新鮮に単離された未刺激で C D 5 6 陽性の N K 細胞もしくは N K 9 2 細胞を、キメラ C H 抗体 (抗体 1 及び抗体 2) 及び野生型 C H 対照抗体 (対象抗体 4) の存在下に、カルセイン標識された C D 2 0 陽性の R a j i 細胞または D a u d i 細胞と共に播種した。標的細胞からのカルセインの放出をモニターし、パーセント細胞傷害性を決定した。パーセント細胞傷害性及び E C ₅₀ は、上記の C D C アッセイについて述べたようにして計算した。結果を、表 1 3 ならびに図 6 A 及び 6 B に示す。

30

【 0 2 8 5 】

前記キメラ C H 抗体、抗体 1 及び抗体 2 は、R a j i 細胞または D a u d i 細胞に対する A D C C 活性 (表 1 3) を媒介しない。

【 0 2 8 6 】

【表 15】

表 13：CD3×CD20キメラCH領域を含む二重特異的抗体は、エフェクター機能を測定するADCCアッセイにおいて低下した活性を示す

ADCC				
標的細胞→	Daudi		Raji	
	EC50 [M]	最大細胞 傷害性 (%)	EC50 [M]	最大細胞 傷害性 (%)
対照Ab 4	1.87E-10	~70 [#]	1.48E-09	~65 [#]
Ab 1	NA	NA	NA	NA
Ab 2	NA	NA	NA	NA

NA： 活性なし； #： バックグラウンド細胞傷害性約20%

10

【0287】

実施例8：キメラ抗体の、表面プラズモン共鳴由来の結合親和性及び反応速度定数

キメラ定常重鎖領域を有する抗CD3×抗CD20二重特異的抗体、抗体1抗体及び抗体2は、ヒト及びカニクイザルのFcγ受容体に対するその動的結合パラメータを決定するために、表面プラズモン共鳴（SPR）（Biacore社）技術を用いて分析された。アイソタイプ対照、即ち、wt-IgG1アイソタイプ対照及びwt-IgG4のCPアイソタイプ対照を、同様の方法で試験した。

20

【0288】

簡単に述べると、SPR実験は、カルボキシメチルデキストランでコーティングされた（CM-5）チップを用いたピアコアT200機器において、25で行った。マウスモノクローナル抗ペントヒスチジン抗体（GEヘルスケア）を、標準的なアミンカップリング化学を用いて、CM-5センサーチップ表面に固定化した。Hisタグを付したヒトまたはサルFcγRタンパク質の140RU-376RUを、抗ペントヒスチジンアミン結合されたCM-5チップ上に捕獲し、抗体のストック溶液を捕獲されたタンパク質上に、20μL/minで2.5分間注入した。mAb結合反応をモニターし、低親和性受容体について、定常状態結合平衡を計算した。動的な会合（ k_a ）及び解離（ k_d ）の速度定数が、スクラバー2.0曲線フィッティングソフトウェアを使用して前記データを処理し、且つ1：1結合モデルにフィッティングすることにより決定された。結合解離平衡定数（ K_D ）及び解離半減期（ $t_{1/2}$ ）を、次の速度定数から計算した： K_D （M）= k_d / k_a ；及び $t_{1/2}$ （min）=（ $\ln 2 / (60 * k_d)$ ）。

30

【0289】

【表 16】

表 14：野生型（w t）及びキメラ重鎖抗体のための動力的結合パラメータ

H i s - 捕獲されたヒト F c γ R I に対する 25° Cでの結合				
抗体	k_a ($M^{-1}sec^{-1}$)	k_d (sec^{-1})	K_D ($10^{-9}M$)	$T^{1/2}$ (min)
w t - l g G 1 アイソタイプ対照	1.74E+05	7.48E-04	4.3	15
w t - l g G 4 C P P C アイソタイプ対照	1.71E+05	2.36E-03	13.9	5
Ab 1	NB	NB	NB	NB
Ab 2	NB	NB	NB	NB

NB： 結合は検出されず

10

【0290】

20

表 14 の結果が示すように、抗体 1 及び抗体 2 二重特異的抗体は、野生型（w t）h I g G 1 または h I g G 4 - C P P C ・ C H 領域を有する抗体と比較して、S P R アッセイにおいてヒト F c γ R I への結合を示さない。本発明のキメラ重鎖二重特異的抗体はまた、w t ・ h I g G 1 または h I g G 4 - C P P C 配列を備えた抗体に比較して、幾つかの低親和性ヒト F c R γ 受容体については弱い結合しか示さず、または結合を示さない（例えば、ヒト F c R γ I I A、F c R γ I I B については弱い結合が検出され、またヒト F c R γ I、F c R γ I I I A、または F c R γ I I I B では結合が検出されなかった）（以下の表 15）。

【0291】

【表 17】

表 15：野生型（w t）及びキメラ重鎖抗体についての定常状態平衡結合定常状態平衡結合

H1s-捕獲された低親和性のヒト及び カニクイザル FcγR 受容体への25℃での結合									
試験された抗体	キメラ重鎖抗体に結合する低親和性FcγR のK _D (10 ⁻⁶ M) 値								
	ヒト hFcγRIIA (H131)	ヒト FcγRIIA (R131)	カニクイザル FcγRIIA	ヒト FcγRIIB	カニクイザル FcγRIIB	ヒト FcγRIIA (V176)	ヒト FcγRIIA (F176)	カニクイザル FcγRIIA	ヒト FcγRIIB
w t l g G1 アイソタイプ 対照	1.1	2	4.2	2	4.2	1.5	1.3	0.6	2.3
w t l g G4 (C P C) アイソタイプ 対照	12	10	19.3	9.8	9.6	10	26	5.8	NB
Ab 1	12	19.3	23.1	123	13.9	NB	NB	66.3	NB
Ab 2	11.7	20.5	23.5	233	14.6	NB	NB	42.4	NB

NB： 結合は検出されず

【0292】

実施例 9：キメラ抗体の薬物動態プロファイル

抗体 1 及び抗体 2 の毒物動態プロファイルは、単回の 30 分 I V 注入を受け、続いて 12 週間の観察期間を経た雄のカニクイザル（3 匹の動物 / 治療群）から、血液サンプルを入手することにより評価した。血清中の全薬物濃度の毒物動態分析用の血液サンプルは、投与前、並びに投与後 5 分、5 時間、24 時間、48 時間、72 時間及び 168 時間、14 日、21 日、35 日、49 日、66 日及び 84 の時点で採取した。得られた血清サンプルを直接的酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）により分析して、Ab 1 または Ab 2 の全薬物濃度を決定した。薬物動態学的パラメータを決定するために、非コンパートメント解析（フェニックス W i n N o n L i n）を用いて被験製品の毒物動態を評価した。結果を表 16 に示す（AUC = 濃度対時間曲線下の AUC 面積；C_{max} = 観察された血清中の最大濃度）。

【0293】

【表 18】

表 16：カニクイザルへの単回の静脈内注入後の、カニクイザル血清中でのキメラ抗体の薬物動態プロファイル

パラメータ	単位	1 mg/kg Ab 2		1 mg/kg Ab 1	
		平均	SD	平均	SD
C_{max}	$\mu\text{g/mL}$	33.4	3.79	26.0	4.72
$C_{max}/\text{用量}$	$\text{kg} \cdot \mu\text{g/mL/mg}$	33.4	3.79	26.0	4.72
t_{max}	日	0.0243	0	0.0243	0
$AUC_{0-168\text{ h}}$	日 $\cdot \mu\text{g/mL}$	100	20.1	61.1	8.04
$AUC_{0-168\text{ h}}/\text{用量}$	日 $\cdot \text{kg} \cdot \mu\text{g/mL/mg}$	100	20.1	61.1	8.04
$T_{1/2}$	日	8.14	1.15	14.0	2.64

【0294】

カニクイザルにおける抗体 1 及び抗体 2 の 1.0 mg/kg の単回静脈内投与に続いて、それぞれ 33.4 及び $26.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ の平均ピーク濃度 (C_{max})、及び 100 及び $61.1\text{ 日} \cdot \mu\text{g/mL}$ の平均 $AUC_{0-168\text{ h}}$ 値がそれぞれ観察された。これらの 2 つの分子の見かけの最終半減期は、 $8.14 \sim 14.0$ 日であると推定された。データは、12 週間の観察期間の大半に亘って、Ab 1 及び Ab 2 に対する連続的な露出が全ての動物で維持され、また露出は治療グループ間で同等であったこと示している。被験物質での明白な免疫原性は認められなかった。抗体 1、抗体 2 の全体的な薬物動態プロファイルは、カニクイザルに投与されたモノクローナル抗体に典型的である。

【0295】

実施例 10：CD3 × CD20 二重特異的抗体は、単一特異性抗体よりも低用量で、カニクイザルにおいて CD20 + B 細胞を枯渇させることができる

抗体 1 及び対照抗体 4 × CD3 × CD20 二重特異的抗体投与のインビボでの効力を決定するために、カニクイザルの末梢血中における CD20 + B 細胞レベルの変化を、単一特異性抗 CD20 抗体 (対照 Ab 3) に比較して、抗 CD3 × CD20 二重特異的抗体の投与後に FACS を介して調べた。研究は、次のように投与群あたり動物 3 匹の 8 投与群に編成した雄のカニクイザル (カニクイザル) で実施した：第 1 群は、プラセボ群 (担体対照投与) であった；第 2 群は、単一特異性抗体 (対照 Ab 3；リツキサン) を 30 mg/kg の用量 (サルにおける 30 mg/kg は、最大臨床用量であると考えられ 375 mg/m^2 のヒト用量と同等である) で投与を受けた；第 3 群は、 0.01 mg/kg の二重特異性 CD3 × CD20 対照抗体 4 である；第 4 群 - 0.1 mg/kg の抗体 4；第 5 群 - 1 mg/kg の抗体 4；第 6 群 - 0.01 mg/kg の抗体 1；第 7 群 - 0.1 mg/kg の抗体 1；第 8 群 - 1 mg/kg の抗体 1。血液は、動物に投与する前の - 7 日及び 4 日に採血された。抗体医薬または担体 (プラセボ) の用量は静脈内注入により投与され、血液は投与後第 2、4 及び 7 日に採血された。血液サンプルは、B 細胞 (CD20；表 17) 及び T 細胞 (CD3、下記参照) マーカーについて FACS により分析され、これら細胞型の絶対数が決定された。

【0296】

簡単に説明すると、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の血液を、 1.5 mL の赤血球溶解緩衝液と共にエッペ

ンドルフ管の中で3分間インキュベートした。細胞を $0.4 \times g$ で5分間遠心分離し、FACS洗浄液(PBS + 3% FBS)で2回洗浄し、Fcブロック試薬を用いて室温で10分間ブロックした。次いで、細胞を4で30分間、hCD45及びCD20蛍光試薬に直接結合された抗体と共にインキュベートした。B細胞サブセット(CD20)またはT細胞サブセット(CD3)の定量的決定は、最初に、白血球(WBC)集団の輪郭を描くために、CD45蛍光染色及び側方散乱特性(SSC)境界決定(CD45ブライトSSC dim)からなる不均一ゲーティング戦略を用いて行われた。次いで、関連する蛍光標識された抗体(CD20・APC-Cy7の)の使用を介して、B細胞集団が同定された。染色後、FACSCantoサイトメーターによるFACS取得及びFlowJoソフトウェアでの解析の前に、細胞を2回洗浄した。結果を、表17及び図11A及び11Bに示す。

【0297】

【表19】

表17：処置後のサル末梢血中で循環するCD45、CD20陽性細胞の数

		研究日におけるCD20+ 細胞 (E3/μL)				
治療	動物識別 No.	-7	-4	2	4	7
プラセボ	78	1.87	2.69	1.85	2.09	1.62
	79	1.28	1.31	0.98	1.24	0.98
	80	2.41	2.90	2.23	2.71	1.78
対照 Ab 3	81	0.71	0.80	0.00	0.00	0.00
	82	0.97	2.49	0.00	0.00	0.00
	83	0.71	1.28	0.00	0.00	0.00
CD3xCD20-wtFc (Ab 4) 0.01 mg/kg	84	2.00	2.82	0.03	0.02	0.03
	85	1.23	1.96	0.00	0.00	0.00
	88	1.50	2.29	0.01	0.00	0.00
CD3xCD20-wtFc (Ab 4) 0.1 mg/kg	87	0.79	1.20	0.00	0.00	0.00
	88	1.72	3.05	0.00	0.00	0.00
	89	0.28	0.60	0.00	0.00	0.00
CD3xCD20-wtFc (Ab 4) 1 mg/kg	90	0.63	1.02	0.00	0.00	0.00
	91	0.66	0.65	0.00	0.00	0.00
	92	0.56	1.50	0.00	0.00	0.00
Ab 1 0.01 mg/kg	93	1.16	1.96	0.00	0.00	0.00
	94	0.72	1.49	0.00	0.04	0.00
	95	1.95	1.94	0.02	0.02	0.01
Ab 1 0.1 mg/kg	96	0.48	0.60	0.00	0.00	0.00
	97	1.30	1.82	0.00	0.00	0.00
	98	4.87	5.00	0.00	0.00	0.00
Ab 1	99	0.23	0.34	0.00	0.00	0.00
1 mg/kg	00	1.39	1.93	0.00	0.00	0.00
	01	2.29	2.30	0.00	0.00	0.00

【0298】

表17及び図11Aに示すように、CD3×CD20二重特異的抗体と抗CD20単一

10

20

30

40

50

特異性抗体の投与は、測定された最初の時点（2日目）までに、循環B細胞のベースラインレベルへの枯渇をもたらした。この枯渇は、プラセボ対照動物のコホートでは見られなかった。二重特異性コホートにおけるB細胞枯渇は、二重特異的抗体の1mg/kgの投与後1週間は維持され、また同様に、0.01及び0.10mg/kg用量の二重特異性コホートにおいてもB細胞枯渇が維持された。

【0299】

T細胞（CD3+）レベルもまた、この実験において、蛍光標識された抗CD3抗体によってモニターされた。循環T細胞の一過性の損失が、二重特異的抗体コホート（Ab4及びAb1；全用量）において、投与後第2日に観察された。担体（プラセボ）対照または対照抗体3（リツキサン）の群では、測定した時点においてT細胞の損失（ベースライン未満）は観察されなかった。二重特異的抗体コホートにおいて、T細胞レベルは第4日の時点までにベースラインレベルに戻り、実験終了までベースラインレベルに維持された（図11Bを参照されたい）。

【0300】

抗体1及び抗体4CD3×CD20二重特異的抗体のインビボでの能力は、上記で述べた研究と同様に、CD20+B細胞レベルまたはCD3+T細胞レベルの変化を測定する長期（3ヶ月）の研究において、カニクイザルの末梢血中で測定された。プラセボ（担体）または二重特異的抗体は、第0日において、1.0mg/kg手投与された。末梢血中のB細胞レベルは、両方の二重特異的抗体コホートにおいて第2日までに有意に枯渇し、またプラセボを除く全サンプルにおける研究の長さに亘って、レベルは枯渇したままであった（図12A参照）。T細胞の一過性の損失は、二重特異性コホートにおいて第2日まで観察され、次いで、T細胞第4日までにベースラインレベルに回復し、二重特異的抗体で処置された動物についての研究の全体を通じて（>80日）、測定されたベースラインの付近のままであった（図12B）。T細胞の一過損失は、プラセボで処置した動物では観察されなかった。

【0301】

錠投与量での抗体1及び抗体4CD3×CD20二重特異的抗体のインビボでの能力を測定するために、上記の実験と同様に長期（2月）の研究において、CD20+B細胞レベルまたはCD3+T細胞レベルの変化がカニクイザルの末梢血中で測定された。二重特異的抗体は、第0日において、0.01mg/kgまたは0.001mg/kg（1µg/kg）の何れかで投与された。末梢血中のB細胞レベルは第2日までに有意に枯渇し、より高用量のCD3×CD20二重特異的抗体で治療した動物について観察されたもの（表17及び図11Aまたは12Bに見られる通り）と同様に、レベルは両方のCD3×CD20コホートについての研究の長さに亘って枯渇したままであった（図13A）。非常に低用量（1µg/kg）の二重特異的抗体で処置した動物は、より高用量のCD3×CD20二重特異的抗体で処置した動物に見られるのと同じ一過性のT細胞損失及び回復を経験する（図11Bまたは12Bと比較して図13Bを参照されたい）。

【0302】

記載された研究において観察されたB細胞損失は、CD3×CD20-キメラFc抗体1で治療された動物の末梢血における循環抗体の喪失と相関していた（図14参照）。動物の循環中の抗体曝露は経時的に低下するので、（例えば、動物番号I06881について第81日に観察されるように）B細胞集団は回復し始める。

【0303】

B細胞喪失と、末梢血中の循環抗体の喪失との相関は、CD3×CD20-キメラFc抗体2で治療された動物にも見られる（図15参照）のに対して、動物の循環系における抗体露出は経時的に低下して、B細胞集団は、例えば動物番号I06876について第66日に、また動物番号I06877について第68日に観察されたように回復し始める。同様の相関関係はまた、CD3×CD20-wtFc（Ab4）二重特異的抗体で処置した動物でも見られた（図16参照）。動物の循環中の抗体曝露は経時的に低下するので、B細胞集団は回復し始める（図16参照、例えば動物番号I06870について第91日

に、及び動物番号 I 0 6 8 7 2 について第 6 4 日に観察される)。

【 0 3 0 4 】

実施例 1 1 : C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体は、単一特異性抗体よりも低用量で、カニクイザルのリンパ組織における C D 2 0 + B 細胞を枯渇させることができる

カニクイザルのリンパ組織における C D 2 0 + B 細胞レベルの変化を、単一特異性の抗 C D 2 0 抗体 (対照 A b 3 - リツキサン) と比較して、抗 C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体抗体 1 または抗体 4) の投与後に F A C S を介して検査した。上記実施例 1 0 に概説した研究群 1 ~ 8 と同様に、研究は、次のように投与群当たり動物 3 匹の 8 投与群に編成された雄カニクイザル (*Macaca fascicularis*) において行われた。抗体医薬及び担体の用量は静脈内注入により投与し、投与後第 7 日に動物を屠殺し、組織を採取した。組織サンプルは、白血球 (C D 4 5 +) 、特に B 細胞 (C D 2 0 +) マーカーについて F A C S により分析し、次いで、B 細胞の % 体積を決定した。

10

【 0 3 0 5 】

B 細胞集団を、上記実施例 1 0 に記載の方法と同様に、関連の蛍光標識された抗体 (C D 2 0 A P C - C y 7) 及び F A C S 収集の使用を介して同定した。結果を表 1 8 並びに図 1 7 A 及び 1 7 B に示す。

【 0 3 0 6 】

【表 20】

表 18：処置後のサル腸間膜リンパ節及び脾臓におけるパーセント
CD20 陽性細胞

		腸間膜 リンパ節	脾臓
治療	動物 識別番号	第 7 日	第 7 日
プラセボ	78	38.14	63.22
	79	38.57	62.79
	80	37.36	49.17
対照 A b 3 30 mg / kg	81	6.21	4.5
	82	10.3	3.45
	83	4.21	2.18
Ab 4 0.01 mg/kg	84	13.43	3.14
	85	6.88	2.27
	86	10.78	1.39
Ab 4 0.1 mg/kg	87	1.51	2.37
	88	0.45	1.65
	89	1.24	2.4
Ab 4 1 mg/kg	90	0.63	0.97
	91	0.62	1.93
	92	1.08	1.22
Ab 1 0.01 mg/kg	93	5.38	1.22
	94	6.37	1.89
	95	13.25	6.99
Ab 1 0.1 mg/kg	96	0.43	1.55
	97	0.68	1.75
	98	2.36	2.97
Ab 1 1 mg/kg	99	0.33	1.79
	00	1.6	1.71
	01	0.5	1.21

【0307】

表 18 及び図 17 A に示すように、CD3 × CD20 二重特異的抗体の投与は、抗 CD20 単一特異性抗体と比較して、二重特異性コホートについては、非常に低い用量（0.01 ~ 1.0 mg / kg）で脾臓における組織 B 細胞の枯渇をもたらした。この枯渇は、プラセボ対照動物コホートでは見られなかった。

【0308】

10

20

30

40

50

表 18 及び図 17 B に示したように、抗 CD 20 単一特異性抗体と比較して、CD 3 × CD 20 二重特異的抗体の投与は、二重特異的コホートについて遥かに低用量 (0.01 から 1.0 mg / kg 用量) で腸間膜リンパ節における組織 B 細胞の枯渇をもたらし、0.1 mg / kg 用量及び 1 mg / kg 用量の二重特異的抗体は、単一特異性コホートにおけるよりも効率的な B 細胞枯渇をもたらした。この枯渇は、プラセボ対照動物コホートでは見られなかった。CD 20 のための免疫組織化学的染色 (データは示さず) 時、残留 B 細胞は、単一特異性で処置された (リツキサン (登録商標) の 30 mg / kg) コホートのリンパ節において検出された。残留 B 細胞は、0.1 ~ 1.0 mg / kg の二重特異性抗 CD 3 × CD 20 抗体の用量で処置したコホートから採取した組織では検出されなかった。これらのデータは、Ab 1 及び Ab 1 が Ab 3 より強い B 細胞の殺傷深さを有することを示している。

10

【0309】

実施例 12 : CD 3 × CD 20 二重特異的抗体での腫瘍治療

A. CD 20 × CD 3 二重特異的抗体での治療は、NSG マウスにおける Raji 腫瘍増殖を抑制する

腫瘍増殖を減少させるのに選択された抗 CD 3 × CD 20 二重特異的抗体の有効性を評価するために、ジャクソン研究所 (バーハーバー、メイン州、米国) から購入した NSG マウス (NOD / LtSz - SCID / IL2Ry^{u11} マウス) に、 2×10^6 個の Raji 腫瘍細胞及び 5×10^5 個のヒト PBMC を皮下に同時移植した (第 0 日)。同じ日に、マウス (N = 処置群あたり 5 匹のマウス) は、マウス当たり 0.4、0.04 または 0.004 mg / kg の腹腔内投与量の抗体 1 または対照抗体 5 (無関係な標的に IgG 1 抗体) の何れかで治療された。第 0 日で開始して、マウスは週 2 回、研究の残余のための薬物または担体の腹腔内投与で治療された。腫瘍の大きさはカリパスを用いて週に 2 回測定し、腫瘍体積は、体積 = (長さ × 幅²) / 2 として算出した。統計的解析は、Graph Pad ソフトウェアの Prism 5.0 (マッキントッシュ版) を用いて行った。

20

【0310】

統計的有意性は、Tukey の多重比較事後テストを用い、2 方向 ANOVA により決定した。各読み出しからのデータを、治療群の間で比較した。P < 0.05 の閾値を統計的に有意と看做した。

30

結果は、図 7 A ~ 7 F に示されている。これらの結果は、抗体 1 (CD 3 × CD 20 - キメラ Fc) が、同時移植されたヒト免疫細胞をもたないマウスにおいて、Raji 腫瘍をターゲティングし、試験された用量において完全な腫瘍増殖抑制をもたらした (図 7 C : 0.4 mg / kg の Ab 1 ; 図 7 E : 0.04 mg / kg の Ab 1 ; 図 7 F : 0.004 mg / kg の Ab 1)。この実施例は、CD 3 × CD 20 二重特異的抗体 1 での治療は、腫瘍移植の時点で開始して、腫瘍増殖を阻害するのに有効であったことを示している。Raji 腫瘍の増殖は、0.4、0.04 または 0.004 mg / kg の抗体 1 の用量を投与されたマウスにおいては、対照に比較して、23 日まで完全に抑制されたままであった。また、抗体 1 または対照抗体は何れも、研究中のマウス体重に対して顕著な影響を持たなかった (データは示さず)。

40

【0311】

CD 3 × CD 20 二重特異的抗体の抗腫瘍効果が、(上記で述べたのと) 同様の NSG マウスモデルにおいて更に試験されたが、各 NSG マウスは第 1 日に 1 mg マウス IgG (mIgG2a・Fc) を投与され、その後は週 1 回投与された。結果を図 8 A ~ 8 B に示す。

【0312】

この実験は、CD 3 × CD 20 二重特異的抗体 1 (CD 3 × CD 20 - キメラ Fc) または CD 3 × CD 20 二重特異的抗体 4 (CD 3 × CD 20 - wt Fc) の何れかでの治療は、循環 IgG の存在下で試験された二重特異性 Ab の用量において、腫瘍移植時に始まった腫瘍の増殖を阻害するのに有効であったことを示している (図 8 A ~ 8 B)。図 8

50

Aに見られるように、抗体1 (CD3 × CD20 - キメラFc二重特異的抗体) は、この実験においてIgG補充の有無にかかわらず、試験された時間に亘って完全な腫瘍増殖阻害を示している。

【0313】

B. CD3 × CD20二重特異的抗体は、NSGマウスで樹立された腫瘍を縮小させるNSGマウスにおいて樹立された腫瘍を減少させることにおいて、選択された抗CD3 × CD20二重特異的抗体の効果を評価した。NSGマウス (NOD / LtSz - scid / IL2Ry^{n u 1 1} マウス) を、ジャクソン・ラボラトリーズ (バーハーバー、メイン州、米国) から購入し、HLA適合のRaji腫瘍細胞 (2×10^6) 及びヒトPBMC (5×10^5) と共に皮下に同時移植した (第15日)。腫瘍は、治療前の15日間に亘って宿主中で樹立された。マウスは、薬物投与の1日前 (-1日) に、それぞれ5mgの補充mIgG2a・Fcを投与された。これらマウスはその後、該実験期間に亘って、マウス当たり5mgのmIgG2a・Fcを週1回投与された (第7日、第14日等)。薬物投与の前に、マウスは腫瘍サイズに従って二つの実験群に分けられた：第1群：~200 - 400 mm³、または第2群：~500 - 900 mm³。

10

【0314】

薬物治療の後、第0日、第3日、第6日、第10日、第14日、第17日、第21日及び第28日に、各マウスにおいて腫瘍サイズをモニター及び記録した。腫瘍サイズは週2回カリパーを用いて測定し、体積 = (長さ × 幅²) / 2として腫瘍堆積を計算した。腫瘍の存在はまた、触診によっても決定した。統計的解析は、GraphPadソフトウェアPrism 5.0 (マッキントッシュ版) を利用して行った。各々の齧歯類からのデータを、治療群間で比較した。結果を図9及び図10に示す。

20

a. 第1群：~200 - 400 mm³ 腫瘍。第0日で開始して、4または5匹のマウスの幾つかのコホートは、それぞれ次のように指示された用量の薬物または担体で、週1回 (即ち、第7日、第14日等) 次のように治療された。

i. 対照：担体のみ

ii. 対照抗体5：0.4 mg / kg

iii. 抗体1 (CD20 × CD3 - キメラFc)：0.4 mg / kg

b. 第2群：~500 - 900 mm³ 腫瘍。第0日で開始して、4匹のマウスの幾つかのコホートは、それぞれ次のように指示された用量の薬物で、週1回 (即ち、第7日、第14日等) 治療された。

30

i. 対照抗体5：0.4 mg / kg

ii. 抗体1 (CD20 × CD3 - キメラFc)：0.4 mg / kg

【0315】

0.4 mg / kgの抗体1 (CD20 × CD3 - キメラFc) を投与したコホートでは、腫瘍は第14日までに完全に消失した。図9を参照されたい。

【0316】

樹立された大きい腫瘍のモデル (即ち、第2群：~500 - 900 mm³) では、抗体1 (CD20 × CD3 - キメラFc) での治療 (0.4 mg / kg) は、第21日めまでに、マウスで観察された腫瘍の完全な除去をもたらした。体積が0.5 cm超で0.9 cm以下の大きなリンパ腫塊 (即ち、CD20発現について陽性の腫瘍) を持ったマウスの治療でのAb1の有効性を示す、図10を参照されたい。

40

【0317】

実施例13：CD3 × CD20二重特異的抗体はインビトロでのPBMC増殖を誘導する

選択されたCD3 × CD20二重特異的抗体及び対照構築物が末梢血単核細胞 (PBMC) を刺激し、増殖を誘導する能力を、ATP触媒定量法 (Cell Titer Glo (登録商標)) を用いて評価した。PBMCの活性化は、細胞増殖を駆動するサイトカインの放出を生じる。

【0318】

50

増殖データは以下のプロトコルを使用して取得した：ヒトまたはカニクイザル由来の P B M C (5×10^5 / ウェル) を、 C D 3 $\times$ C D 2 0 二重特異的抗体または対照抗体、及び市販の抗 C D 2 8 抗体 (ヒト : 200 ng/mL 、カニクイザル : 500 ng/mL) の連続希釈物と共に、 37°C で 72 時間インキュベートした。細胞を C e l l T i t e r G l o (登録商標) を用いて定量し、また細胞生存率の読取りとしての発光は、生存細胞を検出するための V I C T O R X 5 マルチラベルプレートリーダー (P e r k i n E l m e r 社) を使用して測定した。細胞生存率 (刺激されない細胞に対する刺激された細胞の誘導倍率) は、刺激された細胞の発光を刺激されない細胞のベースライン発光で割ることによって決定し、 P r i s m ソフトウェアを使用してグラフにした。結果を表 1 9 ならびに図 1 8 A 及び 1 8 B に要約する。

10

【 0 3 1 9 】

【表 2 1】

表 1 9 : 抗 C D 3 $\times$ C D 2 0 二重特異的抗体により誘導されたヒト及びカニクイザル P B M C 増殖についての $E C_{50}$

抗体	ヒト P B M C 増殖 $E C_{50}$ [M]	カニクイザル P B M C 増殖 $E C_{50}$ [M]
対照 A b 5	NA	NA
CD3xCD20-wtFc (Ab 4)	8.427E-12	3.325E-11
抗体 1	1.163E-10	1.275E-11

20

データは 3 以上の独立したアッセイの中央値である。N A = 活性なし。

【 0 3 2 0 】

表 1 9 及び図 1 8 A ~ 1 8 B に示すように、本発明の両方の C D 2 0 $\times$ C D 3 二重特異的抗体は、ヒトまたはカニクイザル P B M C の増殖を誘導した。抗体 1 は、ほぼ等しい効力でヒト及びカニクイザル P B M C の増殖を誘導した。対照 A b 5 は活性を示さなかった。

【 0 3 2 1 】

実施例 1 4 : C D 3 $\times$ C D 2 0 二重特異性は、インビトロでの活性化 T 細胞による細胞死滅を媒介する

30

ヒトまたはカニクイザル P B M C を、それぞれフィコール・バック F i c o l l - P a q u e 上で、またはリイホライト (L y m p h o l y t e) 哺乳類細胞分離媒体を使用して単離した。単離された P B M C (1×10^6 細胞 / mL のヒト P B M C、または 5×10^6 細胞 / mL のカニクイザル P B M) は、それぞれ 7 日間及び 2 1 日間、組換えヒト I L - 2 (ヒト P B M C については 30 U/mL 、カニクイザル P B M C については 100 U/mL)、及び T 細胞活性化ビーズ (ヒト P B M C については抗 C D 3 / C D 2 8、カニクイザル P B M C については抗 C D 2 / C D 3 / C D 2 8) を含有する完全培地中 ($10\% \text{ FBS}$ 、 100 U/mL のペニシリン、 $100 \mu\text{g/mL}$ のストレプトマイシン、 $292 \mu\text{g/mL}$ の L - グルタミンを補充した R P M I) の中で活性化された。C D 2 0 を発現する R a j i 細胞 (2×10^6 細胞 / mL) を、 37°C において 30 分間、 $8 \mu\text{M}$ カルセイン A M で標識し、培地で 3 回洗浄した。カルセイン標識標的細胞 ($10,000 \sim 20,000$ 細胞 / ウェル) を、活性化 T 細胞 (1 エフェクター / 標的細胞比 10) 及び抗体 1、抗体 4 または対照 A b 5 の連続希釈 (ヒト濃度範囲 : $2 \text{ nM} \sim 0.00003 \text{ nM}$ 、カニクイザル濃度範囲 : $6.6 \text{ nM} \sim 0.002 \text{ pM}$) と共に、 $200 \mu\text{L}$ の完全培地中に 37°C において 2 時間播種した。インキュベーションの後、プレートを遠心分離し、蛍光分析のために上清を半透明の黒色透明底プレートに移した。パーセント細胞傷害性は、次式を用いて計算した。

40

【 0 3 2 2 】

$$\% \text{細胞傷害性} = ((F S - F S R) / (F M R - F S R)) * 100 \%$$

50

【 0 3 2 3 】

ここで、F S は被験ウエルからのカルセイン放出であり、F S R は自発的なカルセイン放出であり、F M R は、トリトン X で溶解した細胞からの最大カルセイン放出である。

【 0 3 2 4 】

細胞生存率の EC_{50} (A T P 触媒定量) は、P r i s m ソフトウェアを用いて決定した。細胞溶解 (細胞傷害性) は、カルセイン放出により最大放出の割合として測定した。パーセント細胞傷害性は、最大放出及び決定された EC_{50} 値に比較したときの、観測された放出として決定した。結果を表 2 0、並びに図 1 9 A (ヒト T 細胞) 及び 1 9 B (サル T 細胞) に示す。

【 0 3 2 5 】

10

【表 2 2】

表 2 0 : C D 3 × C D 2 0 に誘導された R a j i 細胞に対する細胞傷害性についての EC_{50} 値

抗体	R a j i 細胞傷害性 活性化されたヒト T 細胞 [M]	R a j i 細胞傷害性 活性化されたサル T 細胞 [M]
対照 A b 5	NA	NT
CD3xCD20-wtFc (Ab 4)	1.571E-11	1.730E-12
抗体 1	2.503E-11	9.104E-12

20

NA = 活性なし; NT = 試験せず

【 0 3 2 6 】

表 2 0 に示すように抗体 1 は、ヒト (図 1 9 A) 及びカニクイザル (図 1 9 B) の T 細胞について、それぞれ 2 5 . 0 p M 及び 9 . 1 0 p M の代表的な EC_{50} 値で、標的細胞殺滅を媒介する。抗体 4 は、ヒト (図 1 9 A) 及びカニクイザル (図 1 9 B) の T 細胞について、それぞれ 1 5 . 7 p M 及び 1 . 7 3 p M の代表的 EC_{50} 値で、標的細胞の殺滅を媒介した。対照の活性は観察されなかった。

【 0 3 2 7 】

フローサイトメトリーによってヒト C D 2 0 を発現する標的細胞の特異的殺滅をモニターするために、B 1 6 F 1 0 . 9 親マウス骨髓腫細胞 (C D 2 0 を発現しない) 及び C D 2 0 を安定に発現するように操作された B 1 6 F 1 0 . 9 細胞 (B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0) を、1 μ M の蛍光追跡色素のカルボキシフルオレセイン・ジアセテート・スクシンイミジルエステル (C F D A - S E) 及びバイオレット細胞追跡剤でそれぞれ標識した。標識した後、細胞を 1 : 1 の比率で混合し、3 7 °C で一晩播種した。これとは別に、ヒト P B M C を、補充された R P M I 培地中に 1×10^6 細胞 / m L で播種し、3 7 °C で一晩インキュベートして、接着性マクロファージ、樹状細胞、及び幾つかの単球を枯渇させることによりリンパ球を豊富化させた。翌日、標的細胞を、接着細胞を枯渇させた生来の P B M C (エフェクター / 標的細胞の比率は 4 : 1)、及び被験 C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体または I g G 1 対照抗体 5 の連続希釈物 (濃度範囲: 6 6 . 7 n M ~ 0 . 2 5 p M) と共に 3 7 °C で 4 8 時間、同時インキュベートした。酵素フリーの細胞解離緩衝液を用いて細胞培養プレートから細胞を除去し、F A C S によって細胞を分析した。F A C S 分析のために、死滅 / 生存遠赤細胞追跡剤 (I n v i t r o g e n 社) で細胞を染色した。殺滅の特異性を評価するために、細胞を生きたバイオレット及び C F D A - S E で標識された集団に関してゲーティングした。各集団のパーセントは、調整された生存率の計算について次のように報告された:

30

$$\text{調整された生存率} = (R 1 / R 2) * 100$$

ここで、 $R 1 = [(B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0) / \text{バイスタンダー細胞} (B 1 6 F 1 0 . 9)] * 100$ (但し、抗体の不存在で)

40

$R 2 =$ 同じ比率 (但し、被験抗体の存在下で)

50

【 0 3 2 8 】

【 表 2 3 】

表 2 1 : B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0 細胞における標的特異的殺滅に
 ついての EC_{50} 値

抗体	% 生存 B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0 細胞 [M]
対照 A b 5	NA
CD3xCD20-wtFc (Ab 4)	1.282E-11
抗体 1	1.952E-11

NA = 活性なし

【 0 3 2 9 】

C D 3 × C D 2 0 - キメラ F c (抗体 1) 及び C D 3 × C D 2 0 - w t F c (抗体 4) の両方が、細胞の混合集団における C D 2 0 発現標的細胞のみを特異的に死滅させるように (図 2 0 A - B)、ヒト T 細胞に指令した。標的細胞の死滅は、二重特異的抗体の存在下でのみ観察され、B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0 細胞は抗体 1 (EC_{50} : 1 9 . 5 p M) 及び抗体 4 (EC_{50} : 1 2 . 8 p M) によって用量依存的に枯渇された (図 2 0 B)。試験した最高用量 (1 0 μ g / m L) において、C D 2 0 発現細胞の 5 % 未満が生存していた (図 2 0 B)。細胞死の証拠は対照 A b 5 及び I g G 1 対照抗体を用いた、親 B 1 6 F 1 0 . 9 細胞集団または B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0 集団においては観察されなかった。

【 0 3 3 0 】

実施例 1 5 : C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体は、2 0 時間 F A C S インビトロアッセイにおいて、T 細胞上の早期活性化マーカー C D 6 9 を上方調節する

C D 6 9 + は、T 細胞が活性化されていることを示す最も初期の誘導性細胞表面マーカーの一つである。T 細胞活性化は、C D 6 9 のような特定の細胞表面マーカーの情報調節を調べることによって決定することができる。

【 0 3 3 1 】

全血においてヒトまたはカニクイザル T 細胞上の早期活性化マーカー C D 6 9 を情報調節する C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体の能力が、2 0 時間インビトロ F A C S アッセイにより決定された。簡単に言えば、T 細胞活性化は、新鮮に単離されたヒトまたはカニクイザルの新鮮に単離された全血 (1 0 0 μ L) を、最終容積 2 0 0 μ L の R P M I + L グルタミン中の抗体 1、抗体 4 または対照 A v 5 の 5 倍 (ヒト) または 1 0 倍 (カニクイザル) 連続希釈液 (濃度は 5 0 n M ~ 0 . 0 0 0 6 n M) の共に、平底の 9 6 ウエルプレートにおいて 3 7 ° で 2 0 時間インキュベートすることによって評価される。インキュベーション後、該プレートを 1 0 0 0 r p m で 5 分間スピンドウンして血漿を除去した。T 細胞上での C D 6 9 の上方調節を測定するために、C D 2 及び C D 6 9、ならびに C D 4 5、C D 4、C D 8、及び C D 1 9 (ヒト) または C D 1 6 (カニクイザル) の何れかに対して直接結合した抗体を含む表現型カクテルを、4 ° で 3 0 分間、前記血液に直接添加した。赤血球を、1 . 5 m L の P h a r m L y s e 緩衝液を用い、製造業者の指示に従って 1 5 分間溶解した。細胞を 2 回洗浄し、2 0 0 μ L の冷 P B S + 1 % F B S 中に再懸濁し、B D ・ F A C S C a n t o サイトメーターを用いたフローサイトメトリーにより分析した。C D 4 + T 細胞は、最初に生存可能な小 C D 4 5 + リンパ球上でゲーティングし、次いで、C D 1 9 - / C D 2 + / C D 4 + T 細胞 (ヒト) または C D 1 6 - / C D 2 + / C D 4 + T 細胞 (カニクイザル) 上でゲーティングすることにより同定された。

【 0 3 3 2 】

総 C D 2 + エフェクター細胞のうちの、活性化 (C D 6 9 +) T 細胞の割合が報告され

ている。表 2 2 及び図 2 1 を参照されたい。この結果は、C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体が、初期活性化マーカー C D 6 9 によって検出されたように、T 細胞を顕著に活性化したことを示している

【 0 3 3 3 】

【表 2 4】

表 2 2 : B 1 6 F 1 0 . 9 / C D 2 0 細胞における標的特異的殺滅
についての E C ₅₀ 値

抗体	% 活性化された T 細胞 (C D 6 9 +) [M]
対照 A b 5	NA
CD3xCD20-wtFc (Ab 4)	7.907E-11
CD 3 × C D 2 0 - キメラ Fc (抗体 1)	1.560E-11

NA = 活性なし。

【 0 3 3 4 】

実施例 1 6 : C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体は、T 細胞の標的細胞とのクラスターリングを誘導する

細胞クラスターリングフォーマットを使用して、C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体は、その二重特異性結合性アームを介して、T 細胞を標的細胞 (C D 2 0 + 細胞) と架橋させることを決定した。エフェクター細胞を C F S E で 2 4 時間前染色し、C D 2 0 + 細胞をバイオレット細胞追跡剤で前染色し、無関係の対照抗体 (対照抗体 5、無関係な I g G 1 アイソタイプ抗体) とのインキュベーションの後に、別々の象限へとゲーティングした。図 2 2 A を参照されたい：これは無関係の抗体での治療のための細胞混合物中にクラスターリング (二重染色) は存在しないことを示す。C D 3 × C D 2 0 二重特異的抗体とのインキュベーション後、細胞クラスターは、C F S E 及びバイオレットの両方での染色に起因して出現する (図 2 2 B 参照、太字の四角で協調されているように、散乱プロット上の左上象限)。

【 0 3 3 5 】

実施例 1 7 : C D 3 + 細胞上での阻害的 T i m - 3 及び P D - 1 マーカーの発現

T 細胞の機能不全または枯渇は、腫瘍を有する宿主において起きる。T i m - 3 及び P D - 1 受容体は、慢性疾患状態において消耗した T 細胞のマーカーとして同定されている。研究者である S a k u i s h i、K ら (J . E x p . M e d . 2 0 7 (1 0) : 2 1 8 7 - 2 1 9 4、2 0 1 0 年) によると、T i m - 3 及び P D - 1 について陽性である腫瘍浸潤性リンパ球 (T I L) (T i m - 3 + P D - 1 + T I L) は、増殖障害、並びに I L - 2、T N F 及び I F N - γ を産生する障害により定義されるように、最も深刻な枯渇した表現型を示す。

【 0 3 3 6 】

C D 3 陽性細胞は、H L A 適合性 R a j i 腫瘍細胞及びヒト P B M C を皮下に同時移植された N S G マウスの血液及び腫瘍から抽出された (例えば、上記の実施例 1 2 B 参照)。簡単に言えば、腫瘍は、治療の 1 5 日前に宿主において樹立され、次いでこれらマウスは腫瘍のサイズに基づいて二つの治療群に分けられた (実施例 1 2 B を参照されたい)。血液は、第 9 日に、各研究群 (即ち、第 1 群 : ~ 2 0 0 - 4 0 0 m m ³、または第 2 群 : ~ 5 0 0 - 9 0 0 m m ³) から治療 (二重特異的 A b) されたマウス及び未治療マウスから抜き取った。1 5 0 0 m m ³ に達する腫瘍を有する未治療 (担体または対照 A b) のマウスは、研究の終了時点で屠殺し、これらの腫瘍を P D 1 及び T m - 3 の発現について試験した。

【 0 3 3 7 】

このT細胞実験を循環させるために、Tim-3またはPD-1 (Biolegendから商業的に入手可能)の何れかに直接標識された抗体を使用したマーカー識別のために、生存するCD45 + CD3 + T細胞画分が選択された。Tim-3 + PD-1 + 細胞は、未治療の動物の血液中における循環T細胞の主要な画分であった。しかし、CD20 × CD3二重特異的抗体 (抗体1) で治療された動物の血液中のT細胞は、Tim-3 + PD-1 + 細胞の低い画分を示した。

【0338】

未治療の宿主から腫瘍細胞を分離し、生存細胞を染色した。生存単一細胞についてFACS分析を行い、CD45 + CD3 + 細胞画分についてソートし、次いでこれをTim-3またはPD-1発現について試験した。

10

【0339】

我々は、阻害性受容体のTim-3及びPD-1が、実施例12Bに記載された実験の際に未治療マスのNSG B細胞リンパ腫におけるCD3 + TIL上に発現されたこと、及びTim-3 + PD-1 + 細胞がT細胞浸潤性腫瘍の支配的な画分であることを発見した。

【0340】

実施例18: CD3 × CD20二重特異的抗体での治療は、樹立されたRaji腫瘍を有するNSGマウスにおける抗CD20 + 抗体よりも効果的である

NSGマウスにおいて樹立された腫瘍を減少させるうえでの、選択された抗CD3 × CD20二重特異的抗体の有効性を評価した。NSGマウス (NOD / LtSz - scid / IL2Rvnu11マウス、ジャクソン研究所) を、Raji腫瘍細胞 (2×10^6) 及びヒトPBMC (5×10^5) (第-14日) と同時皮下移植した (上記実施例12Bと同様)。

20

【0341】

CD20 × CD3二重特異性Ab1 (0.4 mg / kg、2回 / 週、ipで投与) は、樹立されたRaji腫瘍を抑制する上でCD19 × CD3 BiTE (0.5 mg / kg ; 5回 / 週、ipで投与) に匹敵し (図23)、またリツキシマブ療法 (8 mg / kg、5回 / 週、ipで投与) よりも優れており (図24)、それによって、Ab1は体積が0.5 cmを超える大きなリンパ腫塊をもった哺乳動物を治療する上で効果的であることを示した。

30

【0342】

実施例19: CD3 × CD20二重特異的抗体でのCD20 + メラノーマの治療

研究者等は、このようなCD20 + メラノーマ細胞のような、患者におけるメラノーマ癌の特定の亜集団は、腫瘍開始特性及び疾患再発の高いリスクを表す可能性がある (Pineら、Mol Ther. 20 (5): 1056 - 1062, 2012, epub 2012 Feb 21)。CD20 × CD3二重特異的抗体Ab1は、それが免疫コンピテントなマウスにおいてhCD20形質導入B16F10.9 (B16F10.9 / CD20) 腫瘍増殖を有意に遅延させたので、CD20を発現するB16F10.9腫瘍細胞に対して強力な活性を示した。

40

【0343】

CD3についてヒト化されたマウス (ヒト化CD3 y εマウス) をCD20遺伝子座においてヒト化し、該マウスが両方のヒト化タンパク質を発現するようにした。ヒト化CD3 / CD20マウスに、ヒトCD20を形質導入した 2×10^5 個のB16F10.9メラノーマ腫瘍細胞 (K. Peters / Charles Lin; デューク大学) を皮下に移植した。マウスは、第0日 (腫瘍移植の日) から、担体 (PBS; n = 5)、または0.4 mg / kgの対照Ab5 (無関係の抗原に対する対照抗体; n = 5)、または0.004 mg / kgのAb1 (n = 5) の何れかを腹腔内に用いて治療された。図25Aに示されるようにして腫瘍体積を測定した。腫瘍が 1500 mm^3 超の堆積に達したときに、マウスを屠殺した。図25Aに示すように、Ab1での治療は、腫瘍移植と同時に開始したときに腫瘍増殖を遅延させた。

50

10

【 0 3 4 5 】

本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態によって範囲を限定されるものではない。実際に、明細書に記載したものに加えて、本発明の種々の改変は、前述の説明及び添付の図面から当業者に明らかになるであろう。このような改変は、特許請求の範囲に記載した範囲内にあるものであることが意図されるものである。

【 図 2 】

・報告された対応の番号がないことを意味する
 ・対応のミソではないことを意味する
 ・最後に更新される ICG 対応チャートに使う番号付け (HGVS, the international ImMunoGenetics Information system, <http://www.imm.org/ICG/ScientificChart/Numbering/Hgvs/GS/GS.html>, created 17 May 2001, last updated 10 Jan 2013)

・ Kabat, E. A. et al., 免疫学的に異なるものがあるタンパク質の配列, 第 5 版, 米国免疫学会社, N I H 公開番号 9 1 - 3 2 4 2 (1991) に掲載された amino acid 配列を使う番号付け

ヒトIGHG1重鎖定常領域 UniProt KB/Swiss-Prot
Accn. No. P01857 (配列番号45)

【図 3】

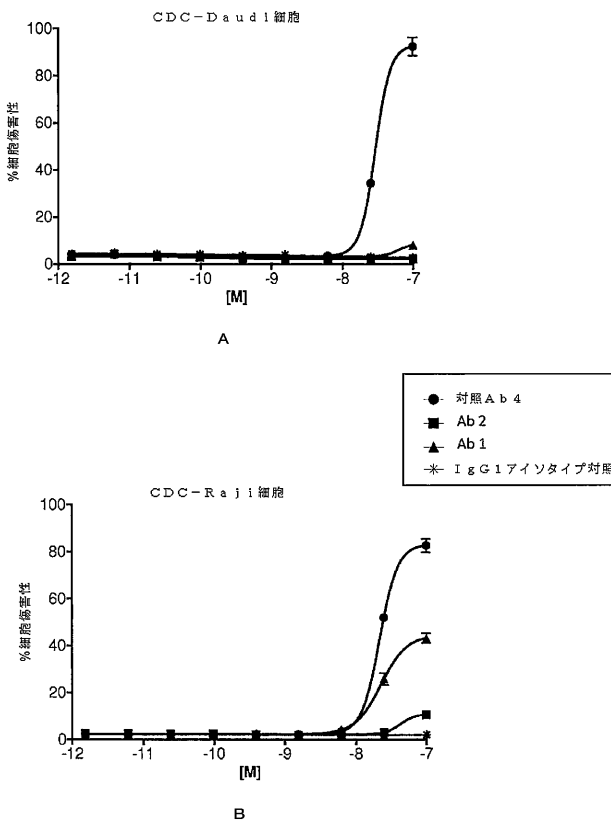
10 20 30 40 50 60
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLOSS
 70 80 90 100 110 120
GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVR KCCVECPPCP APPVAGPSVF
 130 140 150 160 170 180
LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR
 190 200 210 220 230 240
VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
 250 260 270 280 290 300
QVSLTCLVKG FYPDSISVEW ESNQGPENNY KITPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 310 320
VFSCSCVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
 ヒトIGHG2重鎖定常領域 Uniprot KB/Swiss-Prot Accn. No.
 P01859 (配列番号46)

【図 4】

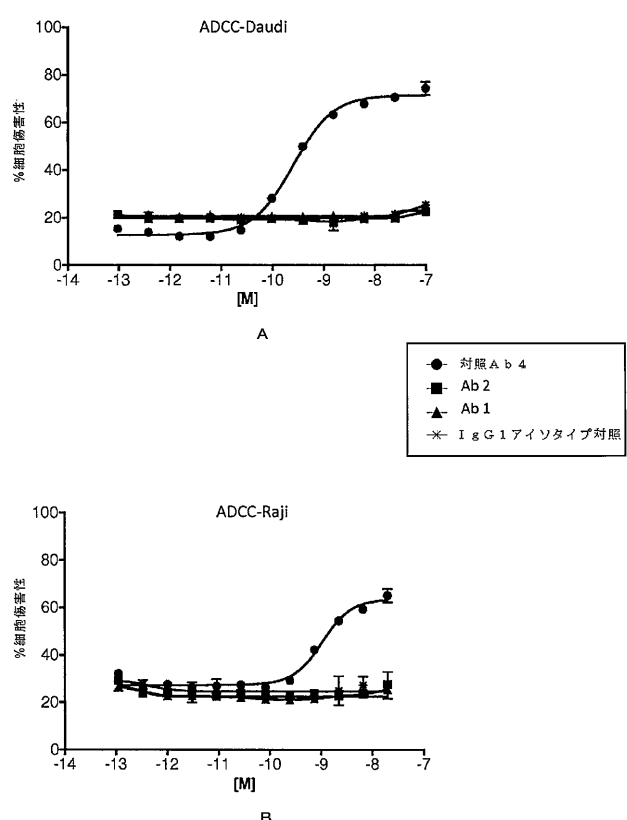
10 20 30 40 50 60
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLOSS
 70 80 90 100 110 120
GLYSLSSVVT VPSSSLGTTK YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV
 130 140 150 160 170 180
FLPPKPKDTL LMISRTPEVT CVVDVSDQED FEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
 190 200 210 220 230 240
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK
 250 260 270 280 290 300
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 310 320
NVFSCSCVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

ヒトIGHG4重鎖定常領域 Uniprot KB/Swiss-Prot Accn. No.
 P01861 (配列番号47)

【図 5】

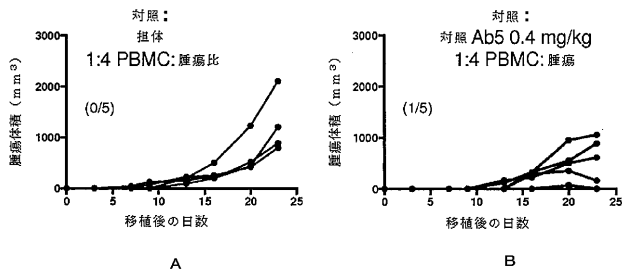


【図 6】



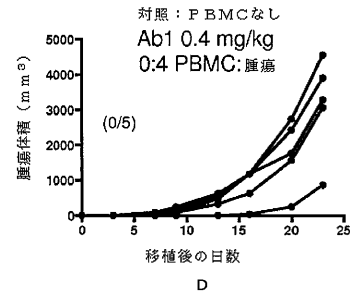
【図 7 - 1】

R a j i 腫瘍細胞および P B M C を移植した N S G マウスの A b 1 または対照治療

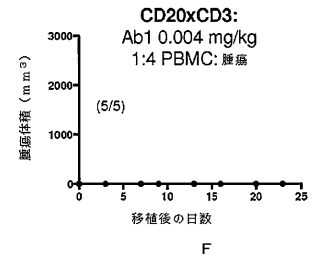
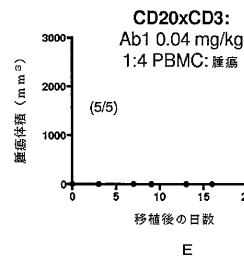
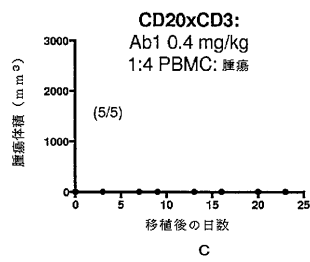


【図 7 - 2】

R a j i 腫瘍細胞を移植した N S G マウスの A b 1 治療 - P B M C 対照なし

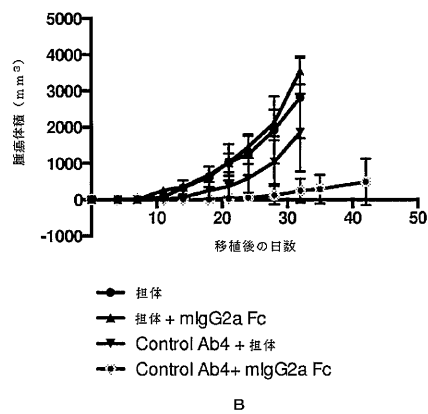
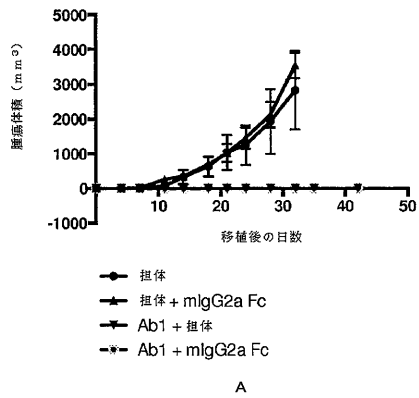


R a j i 腫瘍細胞および P B M C を移植した N S G マウスの A b 1 治療



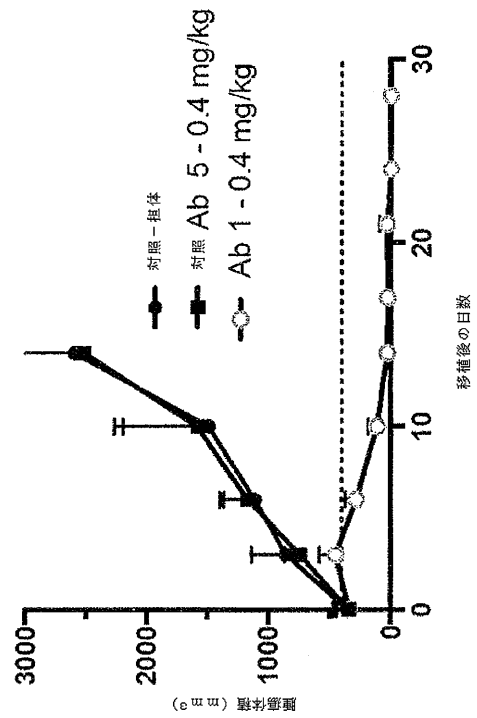
【図 8】

m l g G 2 a ・ F c を補充した N S G マウス



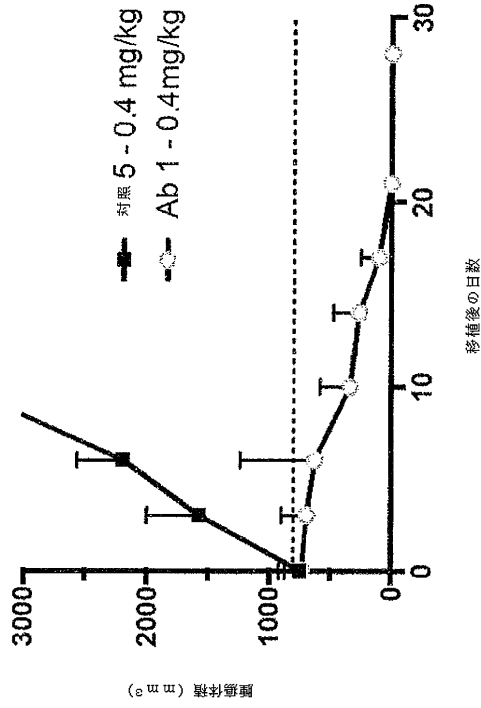
【図 9】

N S G マウスにおいて樹立された ~ 2 0 0 - 4 0 0 m m ³ の腫瘍の C D 3 x C D 2 0 ニ重特異的抗体での治療



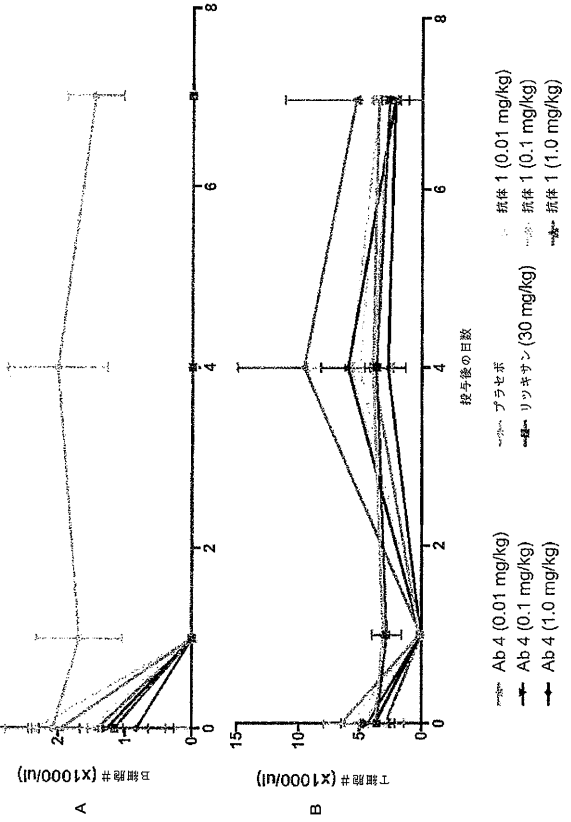
【図 10】

NSGマウスにおいて樹立された $500-900\text{mm}^3$ の腫瘍の
CD3×CD20二重特異的抗体での治療



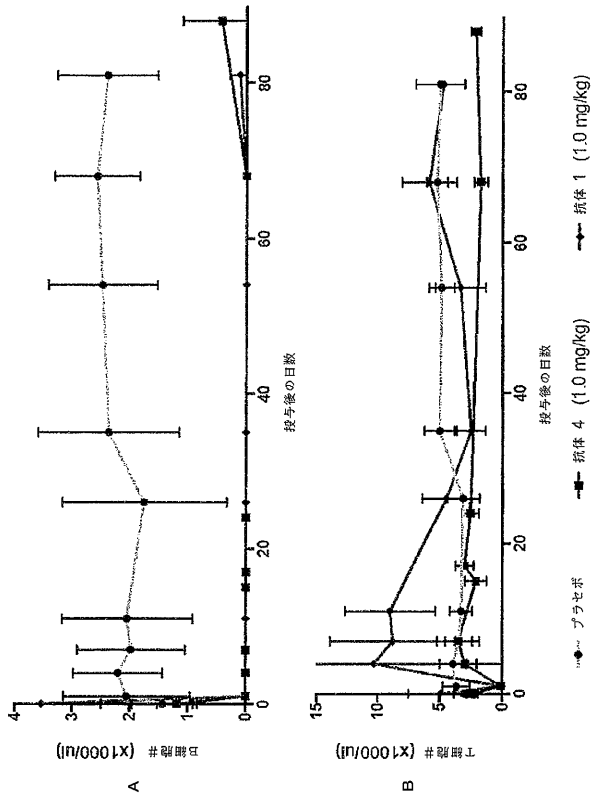
【図 11】

CD20単一特異的抗体およびCD3×CD20二重特異的抗体は、
末梢血液におけるB細胞枯渇を示す



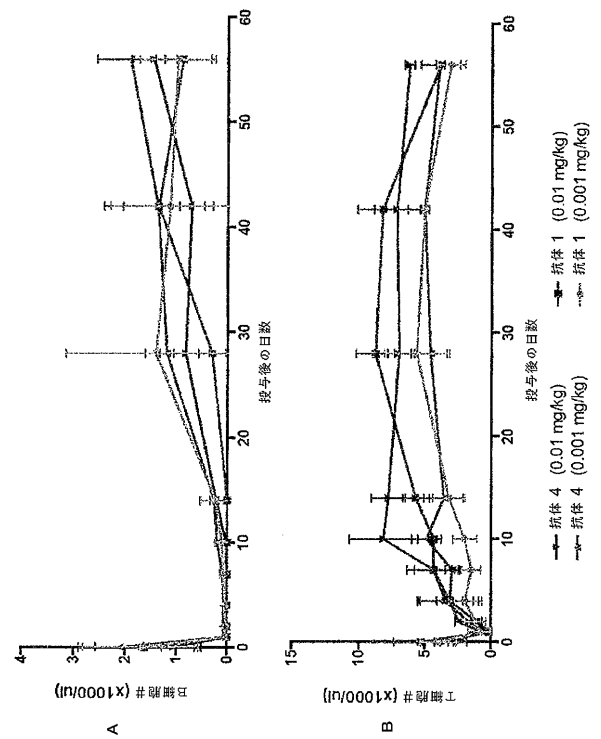
【図 12】

CD3×CD20二重特異性は、サルにおける長期の腫瘍B細胞枯渇を実現する

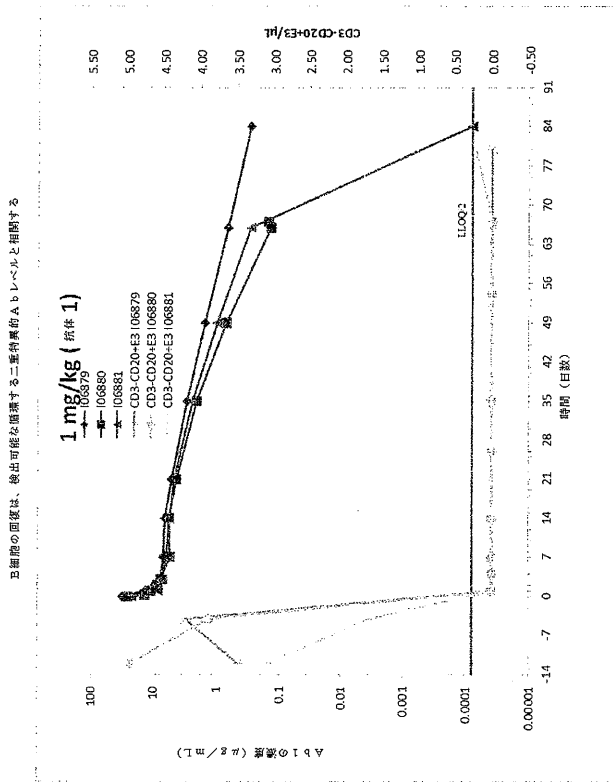


【図 13】

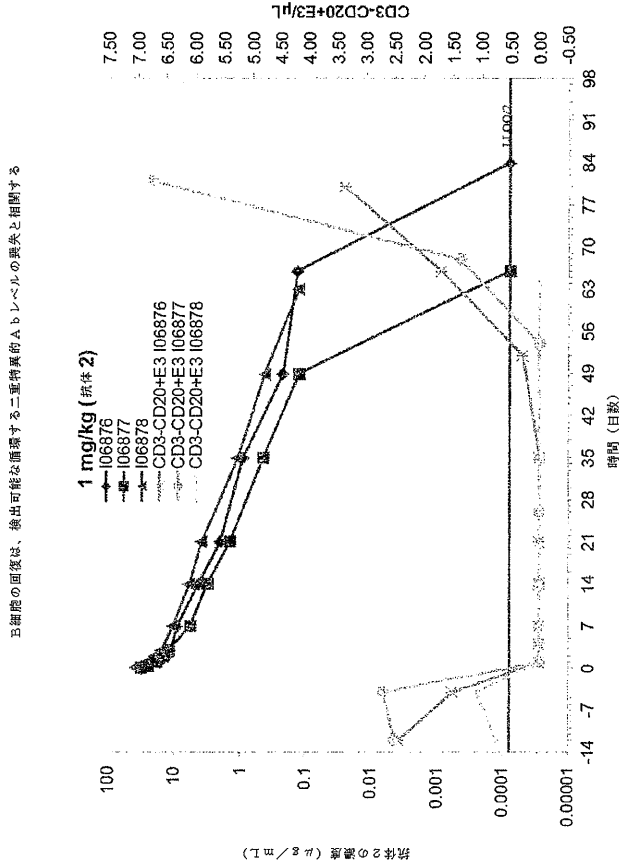
CD3×CD20二重特異性抗体は、低投与量レベルにおいて末梢血中のB細胞枯渇を示す



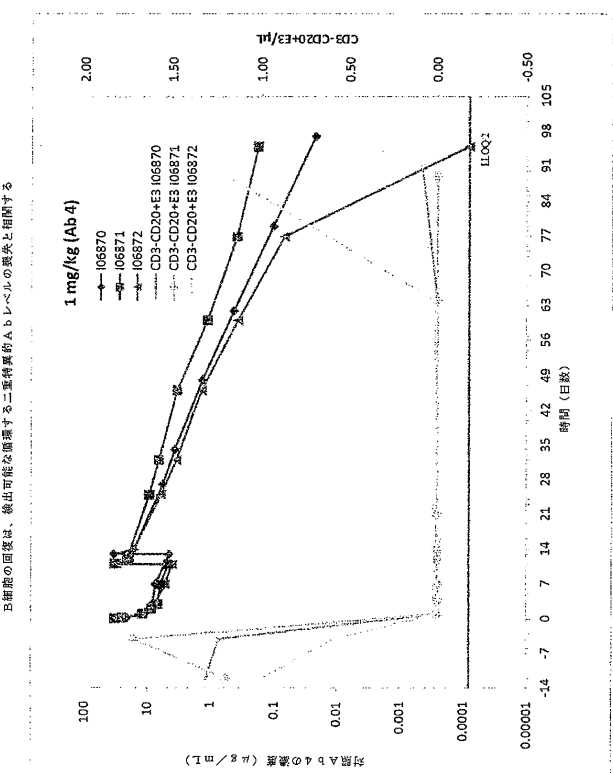
【図 14】



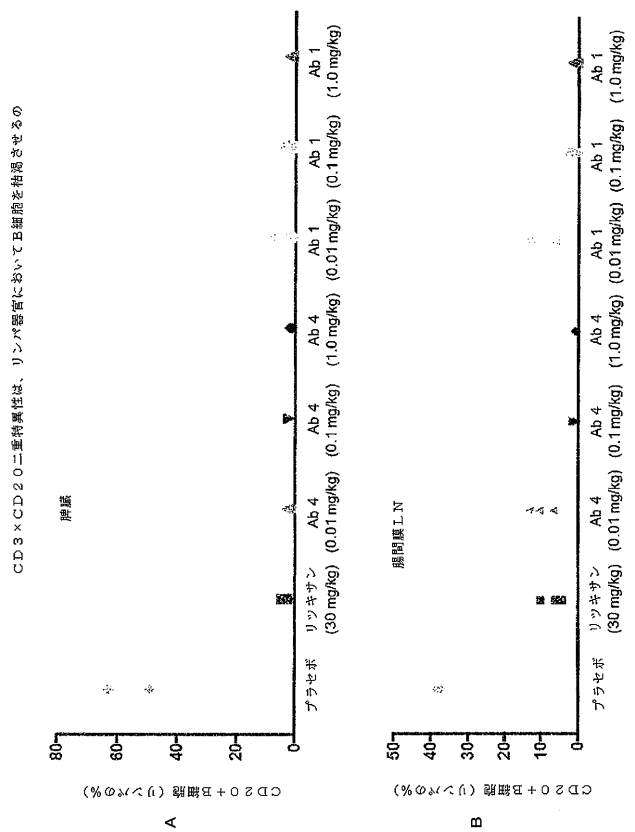
【図 15】



【図 16】

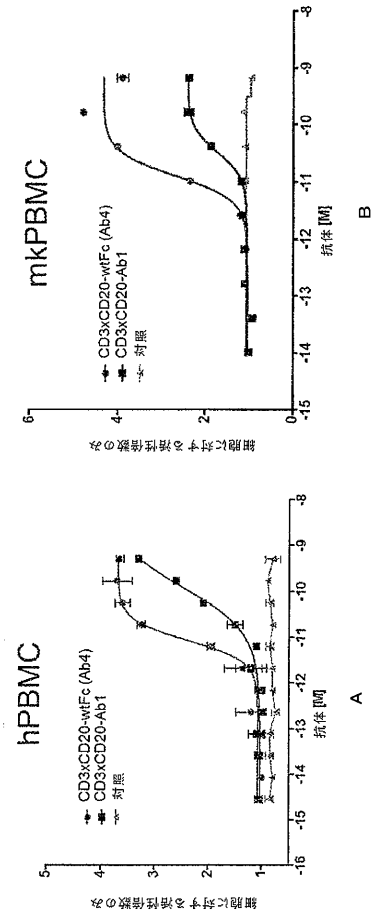


【図 17】



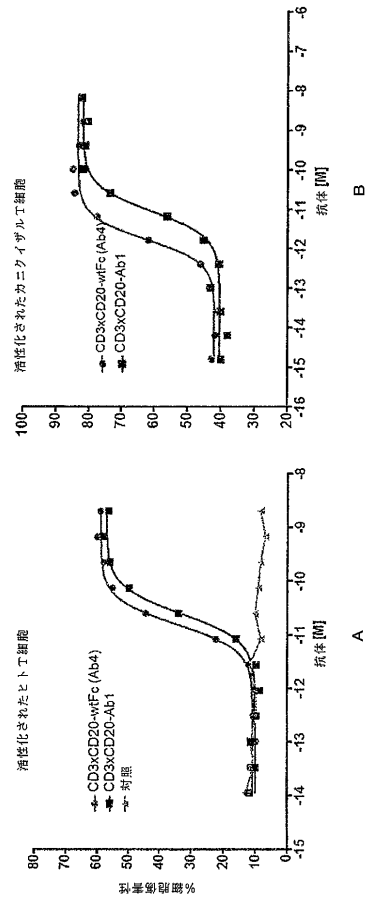
【図 18】

CD3×CD20二重特異性は、インビトロでのT細胞の増殖を誘導する

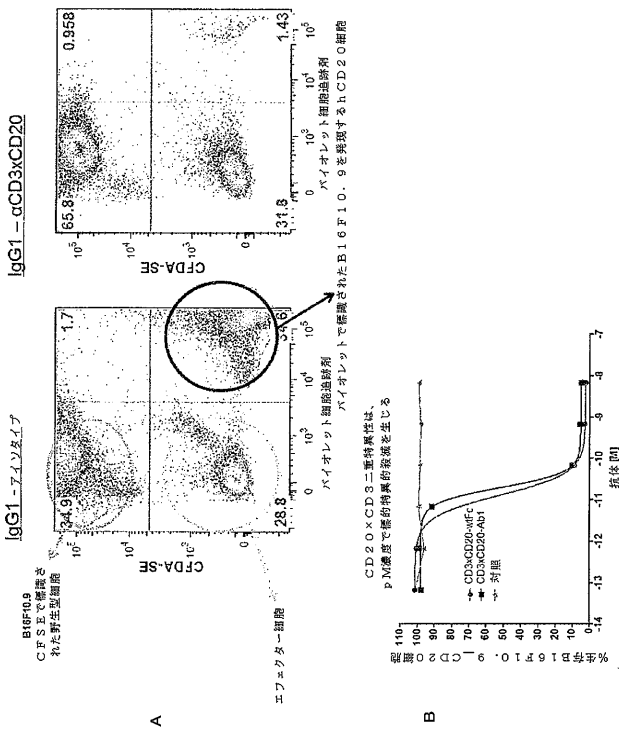


【図 19】

CD3×CD20二重特異性は、インビトロバイオアッセイにおいて活性化されたT細胞による細胞死を誘導する

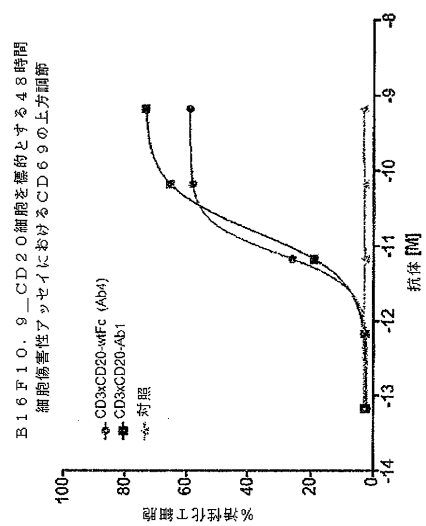


【図 20】

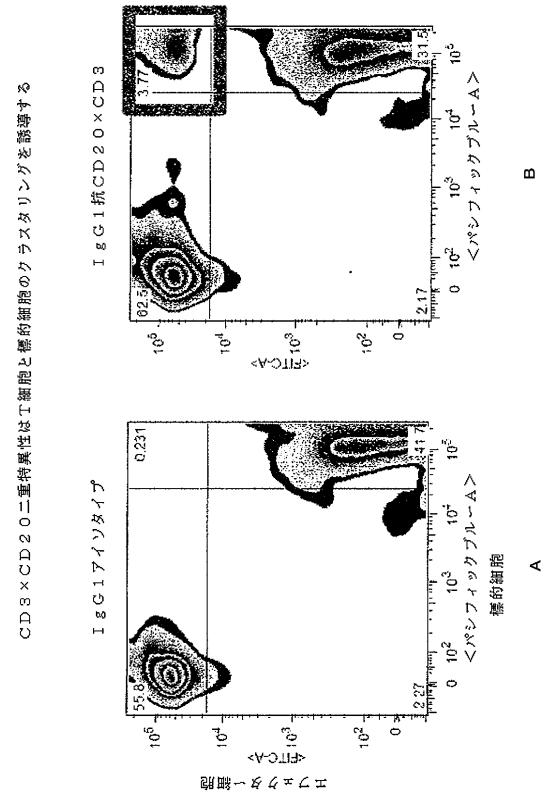


【図 21】

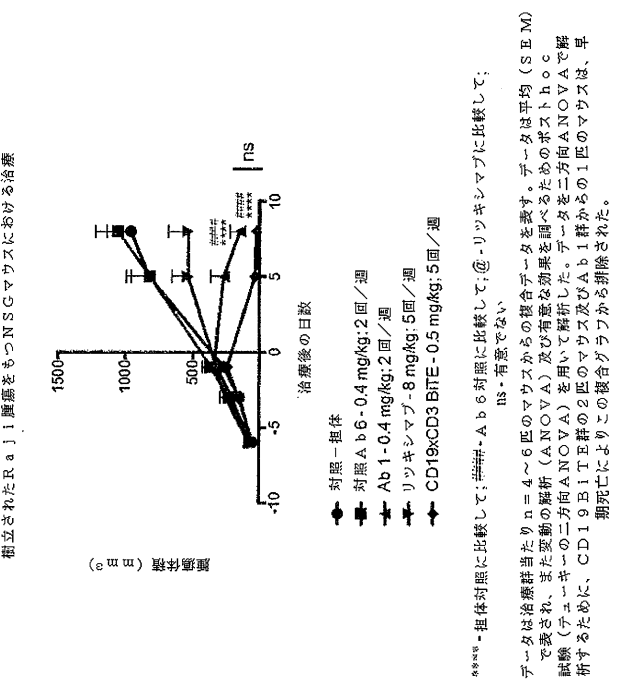
二重特異性Ab治療によってT細胞活性化マーカーが誘導される



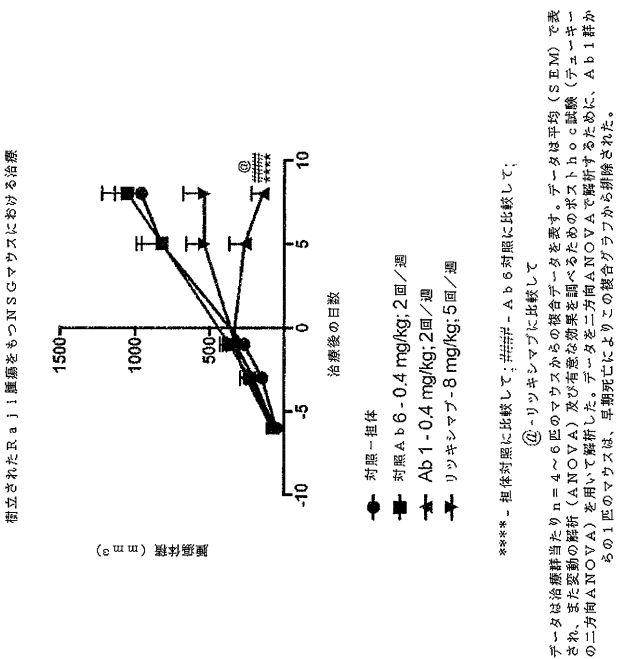
【図 2 2】



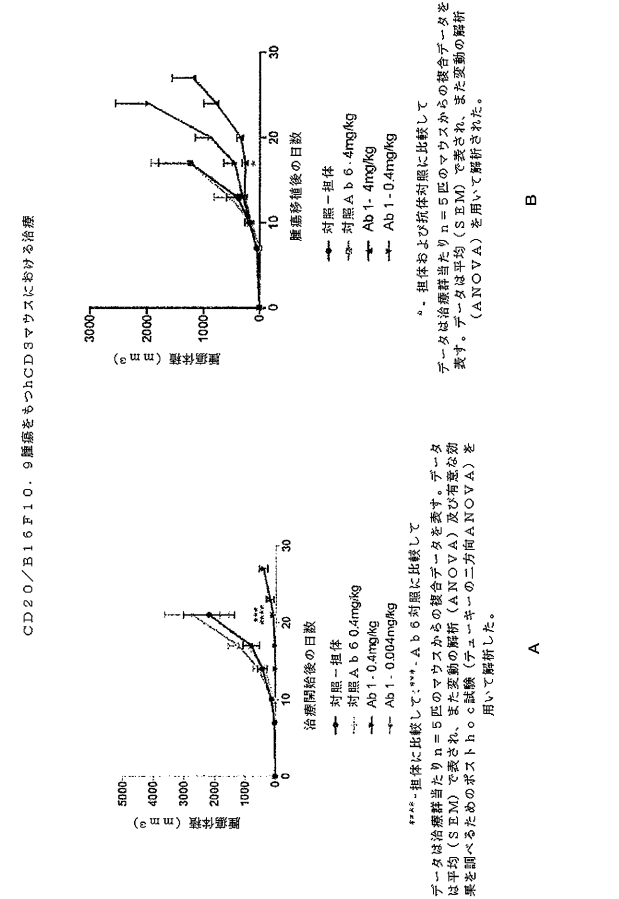
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



【配列表】

2017509643000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/021322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 A61K39/395
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MICHAEL STANGLMAIER ET AL: "Bi20 (fBTA05), a novel trifunctional bispecific antibody (anti-CD20 x anti-CD3), mediates efficient killing of B-cell lymphoma cells even with very low CD20 expression levels", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 123, no. 5, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 1181-1189, XP55089407, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.23626 page 1181 ----- -/--	1-35, 56-60, 75-99, 120-124, 130-134, 139-163

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 June 2015

Date of mailing of the international search report

02/07/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, David

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/021322

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2014/012085 A2 (ZYMEWORKS INC [CA]) 16 January 2014 (2014-01-16)	1-35, 56-60, 75-99, 120-124, 129-134, 139-165
Y	page 1, paragraph 6 - page 2, paragraph 8 page 6, paragraph 15 page 55, paragraph 199 - page 57, paragraph 200 page 61, paragraph 214 page 62, paragraph 217 page 63, paragraph 222 - page 65, paragraph 232 page 84, paragraph 306 page 95, paragraph 343 - page 96, paragraph 348 page 97, paragraphs 355, 360 page 118, paragraph 521 - page 120, paragraph 580 page 129, paragraph 635 - page 130, paragraph 644 page 133, paragraph 671 - page 139, paragraph 755 figure 1a	61-64, 71-74, 125-128, 135-138
Y	----- W0 2014/022540 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 6 February 2014 (2014-02-06)	61-64, 71-74, 125-128, 135-138
A	----- PATEL R ET AL: "IGG subclass variation of a monoclonal antibody binding to human Fc-gamma receptors", AMERICAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY 20130619 SCIENCE PUBLICATIONS USA, vol. 9, no. 3, 19 June 2013 (2013-06-19), pages 206-218, XP002741102, ISSN: 1553-3468 see tables 3 and 4 on pages 214 and 215	1
X,P	----- W0 2014/121087 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 7 August 2014 (2014-08-07)	99, 120-128, 139-162, 164,165
	page 51, column 53; example 2 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/021322

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014012085 A2	16-01-2014	AU 2013289883 A1 CA 2878843 A1 CN 104640562 A EP 2872170 A2 KR 20150036606 A US 2014154253 A1 WO 2014012085 A2	19-02-2015 16-01-2014 20-05-2015 20-05-2015 07-04-2015 05-06-2014 16-01-2014
WO 2014022540 A1	06-02-2014	NONE	
WO 2014121087 A1	07-08-2014	US 2014243504 A1 WO 2014121087 A1	28-08-2014 07-08-2014

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N	
		A 6 1 K 39/395	Y	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A	

(31)優先権主張番号 62/033,460

(32)優先日 平成26年8月5日(2014.8.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 サミュエル・デーヴィス

アメリカ合衆国ニューヨーク州10591.タリータウン.オールドソーミルリバーロード777
 .リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 エリック・スミス

アメリカ合衆国ニューヨーク州10591.タリータウン.オールドソーミルリバーロード777
 .リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ビンドウ・ヴァーギース

アメリカ合衆国ニューヨーク州10591.タリータウン.オールドソーミルリバーロード777
 .リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ジェシカ・アール・カーシュナー

アメリカ合衆国ニューヨーク州10591.タリータウン.オールドソーミルリバーロード777
 .リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ギャビン・サーストン

アメリカ合衆国ニューヨーク州10591.タリータウン.オールドソーミルリバーロード777
 .リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA01 CA10 CA19 CC24 DA01

4C085 AA11 AA13 AA14 AA16 AA33 AA34 BB36 BB42 CC22 CC23

DD62 DD63

4H045 AA11 AA20 AA30 BA40 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74